

TESIS DOCTORAL



VNiVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Facultad de Medicina

Departamentos de Cirugía y Medicina

Unidad de Medicina Molecular

**Análisis epidemiológico, tomográfico y genético
del engrosamiento retiniano en pacientes con
diabetes mellitus tipo 1**

Álvaro Casado Blanco

2020

TESIS DOCTORAL



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Análisis epidemiológico, tomográfico y genético del engrosamiento retiniano en pacientes con diabetes mellitus tipo 1

Álvaro Casado Blanco

2020

Dr. D. Rogelio González Sarmiento, Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca

Dr. Emiliano Hernández Galilea, Profesor Titular de Oftalmología de la Universidad de Salamanca



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

PROF. DR. D. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

PROF. DR. D. EMILIANO HERNÁNDEZ GALILEA, PROFESOR TITULAR DE OFTALMOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado "Análisis epidemiológico, tomográfico y genético del engrosamiento retiniano den pacientes con diabetes mellitus tipo 1" realizado por Álvaro Casado Blanco bajo su dirección en la Unidad de Medicina Molecular del Departamento de Medicina reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para ser presentado ante el tribunal correspondiente y optar al título de Doctor en Medicina por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expiden el presente certificado en Salamanca, a 23 de Octubre del 2020.

Firmado por GONZALEZ SARMIENTO
ROGELIO - 07809730B el día
23/10/2020 con un certificado
emitido por AC FNMT Usuarios

Fdo. Dr. Rogelio González Sarmiento

Fdo. Dr. Emiliano Hernández Galilea

A Clara

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. D. Emiliano Hernández Galilea, por animarme y enseñarme con paciencia a dar los primeros pasos y a finalizar este trabajo, y por apoyarme siempre en otros muchos retos de mi carrera profesional. Por tener sus puertas siempre abiertas.

Al Dr. D. Rogelio González Sarmiento, por su infinita paciencia y comprensión a lo largo de todo este trabajo. Por encontrar siempre un hueco en su imposible agenda para compartir su sabiduría conmigo.

A la Dra. Irene Mariñas del Collado, a D. Carlos Gutiérrez Cerrajero, a la Dra. Purificación Galindo Villardón, al Dr. Fernando Gómez Peralta, a la Dra. Lourdes Juan Marcos y al Dr. Francisco Escudero Domínguez, por sus contribuciones, disponibilidad y generosa ayuda durante la realización de este estudio.

A todos mis compañeros oftalmólogos. Por su continuo apoyo y por su valiente vocación.

A los pacientes diabéticos que han participado en este estudio y a todos los pacientes diabéticos en general.

A mi diabética favorita, por ser para mí un ejemplo de valentía, sacrificio y tenacidad.

A mis padres y a Gracia. Por absolutamente todo.

ABREVIATURAS

ADA: *American Diabetes Association*

ADN: ácido desoxirribonucleico

AFG: angiofluoresceingrafía

AO: ambos ojos

AV: agudeza visual

CD40: *cluster of differentiation 40*

ddH₂O: agua destilada (*double distilled water*)

DMAE: Degeneración Macular Asociada a la Edad

DM 1: Diabetes Mellitus tipo 1

DM 2: Diabetes Mellitus tipo 2

EMCS: Edema Macular Clínicamente Significativo

EMD: Edema Macular Diabético

ENOS: Sintetasa del Óxido Nítrico Endotelial

ET 1: Endotelina 1

EPR: epitelio pigmentario de la retina

ETDRS: *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study*

FDA: *Food and Drug Administration*

FMT: *Fast Macular Thickness*

g: fuerza centrífuga relativa

GAPDH: gliceraldeído 3 fosfato deshidrogenasa

GDRPG: *Global Diabetic Retinopathy Project Group*

GRC: Grosor Retiniano Central

GWAS: Estudios de asociación de genoma completo (*Genome Wide Association Studies*)

HbA_{1c}: hemoglobina glicosilada

HDL: lipoproteína de alta densidad (*High Density Lipoprotein*)

HTA: hipertensión arterial

ICSI: Infusión Continua Subcutánea de Insulina

IL: Interleucina

IMC: Índice de Masa Corporal

KCl: cloruro de potasio

LDL: lipoproteína de baja densidad (*Low Density Lipoprotein*)

M: molaridad

mA: microaneurisma

MgCl₂: Cloruro de Magnesio

MODY: *Mature Onset Diabetes of the Young*

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

RD: Retinopatía Diabética

RDNP: Retinopatía Diabética No Proliferativa

RDP: Retinopatía Diabética Proliferativa

rpm: revoluciones por minuto

SNP: polimorfismo de un único nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*)

OD: Ojo Derecho

OI: Ojo Izquierdo

OCT: tomografía de coherencia óptica (*Optical Coherence Tomography*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PKC: Protein Kinasa C

SD- OCT: OCT de dominio spectral (*Spectral Domain Optical Coherence Tomography*)

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

VPP: Vitrectomía vía Pars Plana

ÍNDICE

1. HISTORIA.....	10
1.1. RESEÑA HISTÓRICA DE LA DIABETES MELLITUS	10
1.2. RESEÑA HISTÓRICA DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA	12
1.3. RESEÑA HISTÓRICA DE LAS MODALIDADES TERAPÉUTICAS DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA	13
2. EPIDEMIOLOGÍA.....	15
2.1. PREVALENCIA E INCIDENCIA	15
2.2. IMPACTO ECONÓMICO SOCIOSANITARIO	17
2.3. IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO PRECOZ	18
3. FACTORES DE RIESGO.....	20
4. PATOGÉNESIS.....	23
4.1. FACTORES BIOQUÍMICOS	24
4.2. FACTORES FISIOLÓGICOS	25
4.3. FACTORES HEMATOLÓGICOS	26
4.4. FACTORES ANATÓMICOS	27
4.5. FACTORES INDUCTORES DE NEOVASCULARIZACIÓN	28
5. CLÍNICA Y SIGNOS OFTALMOSCÓPICOS.....	29
5.1. LESIONES ASOCIADAS AL AUMENTO DE LA PERMEABILIDAD VASCULAR	29
5.2. LESIONES ASOCIADAS A FENÓMENOS VASCULARES OBSTRUCTIVOS	31
6. CLASIFICACIÓN.....	34
6.1. CLASIFICACIÓN ETIOLÓGICA DE LA DIABETES MELLITUS	34
6.2. CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA	35
6.3. CLASIFICACIÓN DEL EDEMA MACULAR DIABÉTICO	40
7. DIAGNÓSTICO.....	43
7.1. EXAMEN OCULAR	43
7.2. PRUEBAS COMPLEMENTARIAS	44

8. APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS.....	52
8.1. CONTROL METABÓLICO	52
8.2. TRATAMIENTO OCULAR	53
8.2.1. Fotocoagulación láser	53
8.2.2. Tratamiento farmacológico	55
8.2.3. Tratamiento quirúrgico	57
9. HERENCIA Y GENÉTICA EN EL EDEMA MACULAR.....	58
9.1. ESTUDIOS DE GENES DIANA	60
9.1.1. Gen del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	60
9.1.2. Gen de la sintasa del óxido nítrico (NOS3)	61
9.1.3. Gen de la endotelina 1 (ET1)	61
9.1.4. Gen de la interleucina 1 beta (IL1B)	62
9.1.5. Gen de la interleucina 4 (IL4)	62
9.1.6. Gen de la interleucina 6 (IL6)	63
9.1.7. Gen de la interleucina 8 (IL8)	64
9.1.8. Gen del CD40 (CD40)	64
9.2. ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN FAMILIAR	65
9.3. ESTUDIOS GWAS	65
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	67
<hr/>	
PACIENTES Y MÉTODOS	73
<hr/>	
1. PACIENTES.....	75
2. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	76
3. MÉTODOS.....	77
3.1. MÉTODOS EMPLEADOS EN EL ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO	77
3.2. MÉTODOS EMPLEADOS EN EL ANÁLISIS TOMOGRÁFICO	79

3.3. MÉTODOS EMPLEADOS EN EL ANÁLISIS GENÉTICO	79
3.3.1. Aislamiento del ADN de alto peso molecular	79
3.3.2. Amplificación de fragmentos de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa	81
3.3.3. Discriminación alélica de polimorfismos	81
4. RECURSOS MATERIALES EMPLEADOS.....	85
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	87
6. ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES.....	88
RESULTADOS	89
<hr/>	
1. ANÁLISIS DE DATOS DEMOGRÁFICOS.....	91
2. ANÁLISIS DE DATOS TOMOGRÁFICOS.....	92
3. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE EL GROSOR RETINIANO CENTRAL Y EL SEXO.....	99
4. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE EL GROSOR RETINIANO CENTRAL Y LA HEMOGLOBINA GLICOSILADA.....	100
5. ANÁLISIS GENÉTICOS DE LA SUSCEPTIBILIDAD AL ENGROSAMIENTO RETINIANO.....	101
5.1. ANÁLISIS DEL SNP rs1799983 DEL GEN NOS3	101
5.2. ANÁLISIS DEL SNP rs5370 DEL GEN ET 1	103
5.3. ANÁLISIS DEL SNP rs699947 DEL GEN VEGF	105
5.4. ANÁLISIS DEL SNP rs16944 DEL GEN IL1B	107
5.5. ANÁLISIS DEL SNP rs2070874 DEL GEN IL 4	109
5.6. ANÁLISIS DEL SNP rs1800795 DEL GEN IL 6	111
5.7. ANÁLISIS DEL SNP rs4073 DEL GEN IL 8	113
5.8. ANÁLISIS DEL SNP rs1883832 DEL GEN CD40	115

DISCUSIÓN 117

CONCLUSIONES 135

BIBLIOGRAFÍA 139

ANEXOS 155

INTRODUCCIÓN

La **Diabetes Mellitus (DM)** es una enfermedad con una alta prevalencia que afecta a más de 463 millones de pacientes en el mundo, y que representa, cada vez más, un problema de salud global. Además, su prevalencia sigue en aumento, estimándose que afectará hasta a 578 millones de pacientes en 2030 (1). En España, hasta un 13 % de la población es diabética, pero aún más preocupante es el hecho de que casi la mitad lo desconoce (2).

En la DM se producen una serie de alteraciones metabólicas que conducen a la hiperglucemia crónica, bien sea por la falta de secreción de insulina, por la resistencia a la acción de esta hormona en los tejidos, o bien por una combinación de ambos mecanismos. Este denominador común favorece la aparición de complicaciones vasculares en distintos órganos, entre ellas, la enfermedad cardiovascular, cerebrovascular o vascular periférica, siendo las complicaciones microvasculares, como la retinopatía, la neuropatía o la nefropatía diabética las más frecuentes y las que ocasionan mayor morbilidad.

El tratamiento de la enfermedad es difícil de optimizar y su objetivo primordial es el control estricto de las cifras de glucosa en sangre. La manera de monitorizar los niveles de glucosa en sangre, y por tanto, la respuesta al tratamiento, consiste en la medición instantánea y repetida de las cifras de glucemia capilar mediante dispositivos electrónicos como los glucómetros (que basan su medición en una reacción enzimática en contacto con la sangre del paciente), y en la determinación de los niveles de **hemoglobina glucosilada (HbA1c)** en sangre, que funcionan como indicadores del estado glucémico del paciente en los últimos dos a tres meses.

Entre los fármacos utilizados para controlar los niveles de glucosa en sangre se encuentran los inhibidores de la alfa glucosidasa, los secretagogos de insulina, los fármacos que afectan la respuesta a la insulina de los tejidos periféricos, las hormonas incretinas,...Pero el tratamiento más utilizado y eficaz, sobre todo en el caso de la DM 1, es la insulina recombinante

humana, en cualquiera de sus distintas presentaciones. Una de las vías de administración más utilizadas en la última década es la infusión continua subcutánea de insulina (ICSI), que mediante el uso de unos dispositivos electromecánicos, o **bombas de insulina**, permiten la administración continua del fármaco con una tasa basal y a una frecuencia y velocidad de infusión determinada, además de la opción de la infusión de dosis adicionales posprandiales, o bolus, siguiendo el programa planificado por un equipo diabetológico o por el propio paciente. La bomba y el sistema de infusión se adaptan a un catéter adherido a la piel del paciente de manera permanente. Este dispositivo se ha demostrado efectivo para tratar la DM 1, disminuyendo la frecuencia y severidad de eventos hipoglucémicos y favoreciendo la libertad y flexibilidad en el estilo de vida.

La **retinopatía diabética (RD)** es la complicación microvascular más frecuente en la DM. Afecta aproximadamente a un 30 % de los diabéticos mayores de 40 años. En los países desarrollados, supone una de las principales causas de déficit visual y ceguera legal en personas adultas en edad activa comprendida entre los 25 y los 74 años (3). Esto se traduce en un problema de enorme trascendencia sociosanitaria, debido a los altos índices de incapacidad laboral, dependencia social y coste sanitario que supone para estos enfermos.

El desarrollo de la RD tiene relación directa con múltiples factores, pero son sin duda el tiempo de evolución de la enfermedad y el control glucémico durante este periodo los que más influyen.

La causa más frecuente de discapacidad visual en estos pacientes es el **Edema Macular Diabético (EMD)**, que consiste en un engrosamiento retiniano de la mácula (el área retiniana más especializada responsable de la visión de precisión) debido al acúmulo de fluido extracelular desencadenado por un aumento de la permeabilidad de los capilares retinianos, asociada a otras alteraciones histológicas de la microvasculatura retiniana, como son los

microaneurismas, las anomalías microvasculares intrarretinianas o la ruptura de la barrera hematorretiniana externa por la incompetencia del epitelio pigmentado de la retina (EPR). En sus primeras fases, el EMD puede ser reversible, sobre todo si se realiza un tratamiento precoz, pero en fases más tardías, se producen cambios retinianos degenerativos con repercusiones funcionales irreparables.

Se estima que en la actualidad hay más de 21 millones de pacientes diabéticos con EMD y que su prevalencia es elevada (2-10%) y está directamente relacionada con el control, la gravedad y la duración de la enfermedad metabólica, así como con la severidad de la retinopatía. De todos ellos, el factor más importante es el tiempo de evolución de la DM. Su incidencia es mayor en los diabéticos tipo 2 que en los diabéticos tipo 1, siendo en estos últimos muy poco frecuente en los primeros años de la enfermedad.

El pronóstico del EMD ha mejorado ostensiblemente en los últimos años, gracias fundamentalmente a la aparición de nuevos tratamientos basados en los múltiples ensayos clínicos que estudian esta complicación. Sin embargo, aún hay muchos pacientes que responden de manera parcial, o incluso no responden a las terapias más avanzadas; o pacientes que presentan EMD en fases más precoces de la RD, o cuya intensidad es desproporcionada al grado de RD. Por tanto, aún deben existir muchos factores desconocidos que, de no ser valorados, finalmente van a condicionar negativamente la recuperación visual de estos pacientes.

La gran repercusión del EMD en la visión de los pacientes, y por lo tanto, en su calidad de vida, y el enorme impacto sociosanitario que supone la carga asistencial y económica que genera su control y seguimiento, hace que sea de gran importancia entender la patogenia de esta entidad para facilitar su diagnóstico precoz y su abordaje terapéutico eficaz.

La detección precoz del engrosamiento retiniano previo a la instauración del EMD es uno de los objetivos de este estudio. Para el análisis preciso de este engrosamiento existen nuevas técnicas diagnósticas que han supuesto una revolución en el estudio, diagnóstico y seguimiento de la patología retiniana. La más importante de ellas es la **Tomografía de coherencia óptica (OCT)**, una técnica no invasiva que proporciona imágenes axiales de alta resolución de la interfase vitreoretiniana, de la estructura retiniana, del espacio subretiniano, y de la unión de la retina con la coroides. Estas imágenes están formadas en base a una escala de colores que traducen la reflectividad de los tejidos tras recibir un haz de luz (diodo láser) monocromática y coherente. La OCT se ha convertido en una herramienta fundamental en el estudio de la patología retiniana. El análisis del EMD con esta tecnología es fácilmente reproducible, y facilita el seguimiento y la detección precoz con un alto nivel de precisión (4, 5).

Una de las dificultades más grandes a la hora de abordar el tratamiento de la RD y el EMD es que la patogenia de la RD es multifactorial, siendo varios los mecanismos implicados: cambios fisiológicos, bioquímicos, hematológicos, endocrinológicos y anatómicos, a los que debemos sumar múltiples factores ambientales y genéticos que condicionan el desarrollo de la enfermedad, su evolución y su respuesta al tratamiento. Se considera que es la interacción entre varios o todos ellos lo que conduce a la expresión concreta de esta enfermedad en cada individuo. Como factor desencadenante inicial, la hiperglucemia y otras alteraciones bioquímicas generan un deterioro del sistema microvascular de la retina conduciendo a una situación de hipoxia. A esta situación, la retina responde con unos mecanismos compensadores de vasodilatación encaminados a restablecer un aporte suficiente de flujo sanguíneo y oxigenación. Pero es precisamente este mecanismo el que induce alteraciones hemorreológicas y estructurales en los vasos sanguíneos, agravando la situación: la neovascularización, que a la

larga se demuestra igualmente ineficaz y contraproducente, es responsable de las alteraciones anatómicas y funcionales más devastadoras de la enfermedad.

Dentro de las anomalías bioquímicas, la activación de la Proteína Kinasa C inducida por la hiperglucemia estaría muy implicada en el desarrollo de complicaciones microvasculares. La activación de las isoformas beta y delta de esta proteína desencadenan alteraciones mediadas por determinadas moléculas que son objeto de este estudio, entre las que se encuentran:

- **Sintetasa del óxido nítrico endotelial (eNOS):** enzima encargada de la síntesis de óxido nítrico en el endotelio. Se ha postulado que la hiperglucemia conduciría a un aumento del anión superóxido (metabolito del estrés oxidativo) dentro de la célula endotelial. Esto se traduciría en una disminución de la síntesis de óxido nítrico, potente vasodilatador implicado en la homeostasis de la vascularización retiniana (6).

- **Endotelina 1 (ET1):** los capilares retinianos carecen de musculatura lisa, y es mediante la contracción y relajación de los pericitos capilares como se regula el flujo vascular capilar retiniano. La ET1 es un potente vasoconstrictor retiniano, por lo que el aumento de su expresión descrito en pacientes con DM conllevaría una reducción del flujo vascular, incluso en pacientes con diabetes de poco tiempo de evolución y sin retinopatía (7).

- **Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF):** es probablemente el principal mediador de la neovascularización retiniana y del aumento de la permeabilidad vascular en los pacientes diabéticos. Es un mitógeno celular específico endotelial que se encuentra expresado en la glía y en las células del epitelio pigmentario de la retina. La señal proinflamatoria inducida por interleucina 1 (IL-1) y el estrés oxidativo activan su expresión, pudiendo intervenir en la apoptosis y muerte de las células del epitelio pigmentario de la retina en diferentes

enfermedades como la retinopatía diabética, la proliferación vitreorretiniana (PVR) y la degeneración macular (8).

Otras moléculas que también intervienen en las alteraciones bioquímicas propias de la DM son las **interleucinas**. Son proteínas extracelulares de bajo peso molecular sintetizadas principalmente por los linfocitos TCD4 que actúan como mediadores de la respuesta inmunitaria, intercomunicando distintas subpoblaciones de leucocitos. Inician la respuesta inflamatoria, y determinan la magnitud y naturaleza de esta (9). Se conocen en la actualidad más de 33 interleucinas (10), las cuales difieren entre si tanto desde el punto de vista químico, como del biológico, y su participación en la inflamación crónica de bajo grado y la activación del sistema inmunitario innato se ha relacionado de manera muy directa con la patogénesis de la DM 1 (11).

- **Interleucina 1:** producida por macrófagos, y células epiteliales induce reacción de fase aguda y la activación y reconocimiento por parte de linfocitos T y macrófagos del lugar donde se desarrolla la respuesta inmune.

- **Interleucina 4:** relacionada con la proliferación de linfocitos B, mastocitos y linfocitos T. Tiene un importante papel en las reacciones alérgicas.

- **Interleucina 6:** segregada por macrófagos, participa en reacciones de fase aguda y también estimula el crecimiento y diferenciación de tanto linfocitos T como linfocitos B.

- **Interleucina 8:** producida por monocitos, macrófagos, queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales, su función es atraer a neutrófilos y linfocitos, así como movilizar, activar y provocar la desgranulación de neutrófilos. También estimula la angiogénesis.

- **CD40** (cluster of differentiation 40): es una molécula miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) que se expresa en células inmunitarias y no

inmunitarias, y que se ha relacionado con la aterosclerosis, el rechazo agudo de trasplantes y varios procesos autoinmunitarios como la tiroiditis, psoriasis, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y DM 1 (12).

Todas estas moléculas son codificadas por genes que presentan una gran variabilidad entre los individuos de una misma especie. Los **polimorfismos genéticos**, que consisten en una variación de la secuencia de ADN entre individuos de la misma especie, pueden encontrarse en regiones codificantes o no codificantes del genoma, y cuando sólo afectan a un nucleótido del ADN se denominan polimorfismos de nucleótido único o SNP. El origen de los polimorfismos es la mutación del ADN. El término mutación patogénica se suele atribuir a mutaciones que están asociadas a una enfermedad, mientras que el término polimorfismo se asocia a una variación común en una población más o menos estable, y no es causa directa de ninguna patología (13). Aunque la mayoría de los SNPs no originan directamente enfermedades, en ocasiones se localizan muy cerca de mutaciones involucradas en procesos patológicos, lo cual los hace útiles como marcadores genéticos, y para el diagnóstico presintomático y prenatal de enfermedades hereditarias. Por tanto, los polimorfismos son útiles para la detección de individuos portadores, o para determinar la compatibilidad en trasplantes, y también pueden influir de forma leve en la susceptibilidad a desarrollar distintas enfermedades (14), entre ellas, la retinopatía diabética y el edema macular diabético.

1. HISTORIA

1.1 RESEÑA HISTÓRICA DE LA DIABETES MELLITUS

El nombre médico de la DM en prácticamente todas las lenguas romances es “diabetes mellitus”. La palabra “diabetes” tiene su origen etimológico en un vocablo griego (*dia*: a través, y *beinen*: pasar) que puede traducirse como “pasar a través con fuerza” (15) y alude al principal síntoma de la enfermedad, una eliminación exagerada de líquido a través del riñón sin retención en el organismo motivada por la hiperglucemia. Por otro lado, el vocablo “*mellitus*” es de origen latino, y significa “dulce como la miel”. En este caso, la palabra se refiere al alto contenido de glucosa de la orina, hecho constatado por el científico Thomas Willis (1621-1675) a mediados del siglo XVII cuando probó la orina de un paciente afectado por la diabetes (15). El término diabetes es atribuido a Demetrius de Apamaia por unos y a Apolonio de Menfis por otros.

Los orígenes de las primeras referencias a la DM datan de antes de la era cristiana. En un manuscrito del siglo XV antes de Cristo atribuido a un médico y sacerdote de la época descubierto por George Ebers en Egipto se describen síntomas que podrían corresponder a la diabetes (15).

También en el siglo II d.C. Galeno se refirió a la diabetes como una enfermedad muy rara, y utilizó términos alternativos como “diarrea urinosa” y “dypsacus”, término este último que expresaba la extrema sed asociada a la enfermedad. Aretaeus de Capadocia (81-131 d.C.) utilizó el término diabetes para describir la condición con una mayor precisión en su sintomatología (15).

En la medicina oriental, cabe destacar a Súsruta, padre de la medicina hindú, como el primer médico que logró diferenciar dos tipos de diabetes, una que se daba en personas jóvenes y delgadas, y otra en personas mayores y obesas.

Desde entonces, se encuentran pocas referencias a esta enfermedad hasta el siglo XI, en el que Avicena, en su famoso Canon de la Medicina, define con precisión los síntomas y signos de la patología.

Tras un largo intervalo posterior, la primera referencia en la literatura de una orina dulce se atribuye a Thomas Willis quien, en 1679, hizo una descripción magistral de la diabetes, quedando desde entonces reconocida por su sintomatología como entidad clínica (15).

El componente hereditario de la enfermedad fue estudiado por Morton y Rondelet a lo largo del siglo XVII. En el siglo XVIII Mathew Dobson identificó la presencia de glucosa en la orina, el inglés John Rollo consiguió mejoras notables en el desarrollo de la enfermedad gracias a un enfoque nutricional basado en dietas ricas en proteínas y grasas y limitado en hidratos de carbono, y Thomas Cawley observó que la diabetes tenía su origen en una alteración del páncreas.

El inicio de la metodología experimental se atribuye a Claude Bernard en 1848. Gracias a sus trabajos aún vigentes sobre el metabolismo y la homeostasis de la glucosa, descubrió el glucógeno hepático y demostró que el sistema nervioso central estaba implicado en el control de la glucosa (consiguió provocar la aparición de glucosa en la orina excitando los centros bulbares mediante pinchazos) (15).

Debemos al patólogo Paul Langerhans el descubrimiento en 1867 de los islotes pancreáticos, y a los estudios de Von Mering y Minkowski en 1889 el conocimiento de la función que estos desempeñaban en el metabolismo de la glucosa. En la segunda década del siglo XX

se había llegado al convencimiento de que el páncreas era el responsable de la diabetes, y Sir Edward Sharpey Schaffer en 1916 y Jean de Meyer en 1910 se encargaron de sugerir la existencia de una sustancia que regulaba el metabolismo del azúcar, siendo muchos los investigadores que en este periodo se dedicaron a estudiar la función exocrina y endocrina del páncreas.

Sin embargo, el descubrimiento concreto de la insulina se lo debemos a los trabajos de Frederick Grant Banting y Charles Herbert Best en el laboratorio de John James Richard MacLeod, y con la ayuda de James B. Collip, que presentaron públicamente sus resultados en 1921. Gracias a ello, Banting y MacLeod fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina en 1923, y la insulina comenzó a fabricarse a finales de ese año, cambiando por completo el horizonte de esta enfermedad para siempre (16).

1.2 RESEÑA HISTÓRICA DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA

A pesar de ser una enfermedad bien reconocida desde el siglo II d.C., no fue hasta la mitad del siglo XIX que fue relacionada con la patología ocular. En 1846, el oftalmólogo francés Appolinaire Bouchardat (1806-1886) describió como pacientes diabéticos podían experimentar una disminución de agudeza visual no justificada por la presencia de catarata y que además esta podía ser parcialmente reversible modificando el control de la diabetes. Años más tarde, Frammois Tavignot realizó observaciones parecidas. En 1851, Herman von Helmholtz inventó el oftalmoscopio directo que permitió el estudio del fondo de ojo, y en 1855, Eduard Jöger (1818-1884) fue el primero en observar, describir y documentar alteraciones diabéticas en la mácula, ayudando a resolver años de controversia científica en los que se dudaba de la relación entre estos signos y la enfermedad. En 1869, Henry Noyes (1832-1900) publicó un artículo

defendiendo esta relación, y Edward Nettleship (1845-1913) la confirmó en 1872 en Londres, presentando la primera prueba histopatológica de una degeneración cistoide de la mácula en un paciente diabético. Nettleship publicó cinco años más tarde otro artículo junto a Sir Steven Mackenzie (1791-1868) que describía en detalle los cambios retinianos anormales inducidos por la diabetes. La retinopatía diabética proliferativa fue descrita en 1876 por Wilhelm Manz (1833-1911) y la primera clasificación en distintos estadios y por tanto, la evolución natural de la retinopatía diabética fue descrita en 1890 por Julius Hirschberg (1843-1925) (17).

1.3 RESEÑA HISTÓRICA DE LAS MODALIDADES TERAPÉUTICAS DE LA RD

Tras la invaluable contribución a la ciencia que supuso el descubrimiento y la fabricación de insulina desde el 1921, el control sistémico de la enfermedad cambió completamente. En cuanto al control oftalmológico, Gerhard Meyer-Schwickerath (1920-1992) estudió el uso de la luz como energía para coagular tejidos retinianos en patologías vasculares, describiendo sus resultados en 1950, y en 1963, Paul Wetzig aplicó sus estudios al tratamiento de la RD. Charles Campbell y Christian Zweng fueron los primeros en utilizar el láser de rubí, pero fueron William Beetham y Lloyd Aiello los que constataron la efectividad de la fotocoagulación de la RD proliferativa. En 1979, el Diabetic Retinopathy Study Research Group demostró que la Panretinofotocoagulación con láser de Xenón o láser Argón reducía significativamente el riesgo de pérdida visual severa, y en 1995, el Early Treatment Retinopathy Study Group (ETDRS) confirmó los resultados de Patz, que había demostrado en 1976 que la fotocoagulación con láser de argón disminuía o estabilizaba el edema macular (17).

En 1970, Judah Folkman sugirió la posible relación de la angiogénesis con el crecimiento y la progresión tumoral, inspirando diversos estudios posteriores que culminaron en 1989 con el

aislamiento del Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), cuyo estudio y aplicación al campo de la oftalmología aportó nuevas perspectivas en el tratamiento de la RD y del edema macular y condujeron al desarrollo de la terapia antiangiogénica que es, hoy en día, la base del tratamiento del edema macular diabético (EMD).

2. EPIDEMIOLOGÍA

La prevalencia e incidencia de la DM ha aumentado espectacularmente en las últimas décadas, hasta convertirse en uno de los mayores problemas de salud de las sociedades avanzadas. La obesidad, el envejecimiento y el sedentarismo, señas de identidad de las últimas generaciones, son los principales factores implicados en este aumento. Las estimaciones en 2019 eran de 463 millones de personas con DM en el mundo. Y el pronóstico para el 2030 estima que este número podría ascender hasta los 578 millones, lo que correspondería a un porcentaje del 10% de la población mundial adulta (1). Teniendo en cuenta que más del 80% de los diabéticos viven en países en vías de desarrollo y que un altísimo porcentaje permanece sin diagnosticar, nos encontramos ante un problema que alcanza la importancia de una pandemia. En España en concreto, la prevalencia reportada de la DM en un estudio del 2012 de Soriguer et al (2) fue de 13.8%, con un 6% de la población que desconoce que tiene la enfermedad.

2.1 PREVALENCIA E INCIDENCIA DE LA RD

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor del 5% de la ceguera global se debe a la RD. De entre las causas de esta disminución de visión, la más importante y que afecta a un mayor número de enfermos, es el EMD, que es más frecuente en pacientes con DM2. Sin embargo, la causa responsable de las pérdidas visuales más graves es la RD proliferativa (RDP), que afecta con mayor frecuencia a los pacientes con DM1.

Hay múltiples estudios acerca de la prevalencia e incidencia de la RD, existiendo una gran variabilidad en los datos que aportan. Existen muchas razones que justifican estas

diferencias: utilización de distintas clasificaciones y métodos y criterios de diagnóstico, heterogeneidad de los pacientes incluidos en las muestras en cuanto a edad, duración y gravedad de la DM, diferencias en el acceso a terapias más eficaces, control diabetológico y perfil de factores de riesgo clásicos, etc. Todo ello añadido a la gran variabilidad inducida en los estudios según las diferencias étnicas, la situación socioeconómica y los niveles de atención a los diabéticos que se dispensa en los distintos países que publican los resultados de sus estudios.

En general, la **prevalencia** de algún grado de RD entre pacientes DM se estima en torno al 25%, y la del EMD, entre el 2 y el 10% (1).

Atendiendo a las diferencias entre países desarrollados, aquellos en vías de desarrollo e incluso poblaciones indígenas, la prevalencia de la RD varía de un 10% al 61% en personas con DM conocida, y de un 1.5 al 31% en DM de diagnóstico reciente (Ruta et al. 2013) (18).

En cuanto a sexos, el *United Kingdom Prospective Study* (UKPDS), con diferentes criterios diagnósticos y de exclusión de RD severa, encontró una prevalencia de RD del 35% en mujeres y del 39% en hombres (19).

Los pacientes tratados con insulina presentan una tasa mayor de RD que los pacientes que no precisan este tratamiento (55.6% y 18.5% respectivamente) (20).

La **incidencia** de RD y EMD es directamente proporcional al tiempo de evolución de la enfermedad, estimándose que a partir de los 15 años de evolución, el 15% de los DM tienen EMD, y que a partir de los 20 años, más del 90% presentará algún grado de RD. Estas cifras son distintas dependiendo del tipo de DM. Aquellos pacientes con DM1 con tiempo de evolución de la enfermedad mayor de 20 años tiene 2.7 veces más RD, 15 veces más RDP, 5 veces más EMD, y 8.7 veces más RDP y EMD que los pacientes con DM2 de menos de 10 años de evolución. En

el estudio *Wisconsin Epidemiologic Study of Retinopathy* (WESDR) la incidencia de EMD en 10 años fue de 20.1% en el grupo de estudio de DM insulinodependiente de inicio antes de los 30 años de edad y del 25.4 y el 13.9% en los DM de inicio después de esa edad insulino y no insulinodependientes respectivamente (21).

En general, se estima que la incidencia anual de RD oscila entre el 2.2 y 12.7 %, y que la progresión anual hacia RD que pueda comprometer la visión lo hace entre el 3.4 y el 12.3 % (1).

2.2 IMPACTO ECONÓMICO SOCIO-SANITARIO

La DM está asociada a una gran disminución de los niveles de bienestar tanto físico como emocional que afecta en gran medida a la calidad de vida de los pacientes (cuantificado como años de vida ajustados por calidad, o QALY por sus siglas en inglés)

En España, un estudio llevado a cabo en el 2013 determinó que el coste directo de la DM en el Sistema Nacional de Salud era de más de 5 mil millones de euros, 1.5 mil millones de euros por las complicaciones asociadas con la DM, entre las que se encuentra la RD, y 2.8 mil millones de euros por la pérdida de productividad laboral (22). Esto representa el 8.2% del coste sanitario global, sólo valorando los costes directos, y no los indirectos. El mayor gasto corresponde al farmacológico (38% del total), y el segundo mayor al hospitalario (33% del total) (22) El estudio eCostes en Cataluña (2011) estimó que el coste por paciente diabético era de 3368 euros frente a 2156 euros en pacientes no diabéticos, siendo este incremento debido fundamentalmente a las complicaciones de la DM, como la RD. Los pacientes diagnosticados con RD consumían 4720 euros anuales (un 34% más que los diabéticos sin esta complicación) (23). Hay que tener en cuenta que el promedio del coste sanitario de esta patología aumenta considerablemente con la gravedad de la RD, lo que sugiere que la prevención y el diagnóstico

precoz de la enfermedad tendrían una importancia capital para evitar los ingentes costes que supone la ceguera por discapacitado. En España, los costes anuales por RD están en torno a los 7990 euros, y los de la ceguera por esta causa en torno a los 1777 euros. A todo esto habría que añadir el gasto medio de los hogares en los que residen pacientes con deficiencia visual, que se incrementan alrededor de 2900 euros. (Ernst & Young et al. 2012) (24).

2.3 IMPORTANCIA DEL DIAGNÓSTICO PRECOZ

La discapacidad visual asociada a la RD, además de suponer un elevado coste como se ha expuesto, supone unas enormes barreras sociales que van más allá de la propia discapacidad. Por lo tanto, detectar precozmente sus formas de riesgo, supone un objetivo primordial de los sistemas sanitarios, y cada vez toma más importancia la implantación de programas de cribado de RD y EMD, sobre todo conociendo el alto porcentaje de enfermos no diagnosticados, y de pacientes con fases asintomáticas de la enfermedad. La realización de exploraciones periódicas del fondo de ojo bajo midriasis a toda la población diabética es la medida más eficaz para ello, y se considera la prueba de referencia. Esta exploración ayuda a detectar y tratar a tiempo las formas con gran riesgo de pérdida grave de la visión o incluso de ceguera. Sin embargo, la gran presión asistencial que conlleva ha hecho que se hayan desarrollado otras alternativas entre las que se encuentra la realización de retinografías con cámaras no midriáticas, en conjunción con el manejo de las imágenes a través de sistemas de Telemedicina que con un manejo sencillo, facilitan que la exploración de la numerosa población diabética pueda ser llevada a cabo más rápido y con la colaboración de personal no necesariamente sanitario, descargando la labor asistencial del especialista en Oftalmología. En la actualidad, existen numerosos estudios y programas en desarrollo basados en la aplicación de la Inteligencia Artificial y el *Deep Machine Learning*, que usan algoritmos informatizados basados

en imágenes de referencia de grandes bases de datos para contrastar la imagen obtenida del paciente y poder realizar un diagnóstico de sospecha e incluso una sugerencia de derivación del paciente (25). El objetivo primordial de todas estas técnicas y protocolos es la detección y prevención de las complicaciones más temidas de la RD, la RDP, y el EMD.

3. FACTORES DE RIESGO

Los factores de riesgo que más influyen en la aparición de RD y EMD son los siguientes, siendo los dos primeros los más relevantes:

- **Tiempo de evolución de la DM:** supone el principal factor de riesgo. En el estudio WESDR se detectó una prevalencia del 99% de pacientes con algún grado de RD a los 20 años de la enfermedad, y una incidencia del 96% de RD en el seguimiento a 14 años de estos pacientes, siendo la tasa de progresión de la RD del 86% y la progresión a RDP del 37%. (21)
- **Edad al diagnóstico de la DM:** la RD y el EMD aparecen más precozmente en pacientes con inicio de la DM previo a la pubertad (26) lo cual favorece que también se den formas más graves de la enfermedad, como indica la cifra de que la prevalencia de RDP es del 23% en el grupo de DM1 de inicio juvenil frente al 10% del de inicio adulto. Además, la tasa de progresión de los pacientes con DM1 de inicio juvenil a los 14 años es también mayor (86%, con un 37% de ellos progresando a RDP (21).
- **Mal control glucémico:** las complicaciones de la DM son consecuencia directa de la hiperglucemia crónica, por lo que un mal control glucémico (habitualmente registrado mediante las cifras de HbA1c) va a conllevar la progresión a formas más severas de la enfermedad, y a afectación multisistémica, como la retinopatía, la neuropatía y la nefropatía diabética. El control intensivo de las cifras de glucemia con insulina reduce o previene el desarrollo de RD en un 27%, y también reduce la progresión a RDNP severa o RDP en un 34 a 76%. También se reduce la incidencia de EMD y con todo ello la necesidad de tratamiento para todas estas complicaciones (27). Datos del estudio UKPDS sugieren un descenso del 35% en complicaciones microvasculares por cada descenso de 1% de la cifra de HbA1c (19).

- **DM insulino dependiente:** diversos estudios han encontrado un aumento en la prevalencia de RD en los pacientes tratados con insulina (55.6%) sobre los pacientes tratados con hipoglucemiantes orales o dieta (24.4% y 9.3% respectivamente) (28). Sabemos que los pacientes con DMID necesitan más tiempo para desarrollar la RD, pero son más propensos a desarrollarla a lo largo de toda su enfermedad, y desarrollarán formas más avanzadas (con tasas de RDP cercanas al 50% a los veinte años de evolución).

- **Microalbuminuria:** ha sido descrita como marcador de riesgo de desarrollo de RDP, de nefropatía y de complicaciones cardiovasculares en pacientes diabéticos.

- **Hipertensión arterial:** en el estudio WESDR la HTA sistólica se relacionó con la progresión a RDP, mientras que la HTA diastólica se asoció a la progresión de la RD, progresión a RDP y a la mayor incidencia de EMD. Se considera que un aumento de 10 mmHg en la TA diastólica a los 4 años de seguimiento puede correlacionarse con un aumento del 35% en la tasa de progresión a los 14 años de seguimiento (21).

- **Embarazo:** aunque aún existe cierta controversia al respecto, son muchos los estudios que han detectado progresión de la RD o aparición de la misma durante el embarazo. En uno de estos estudios (29) se estimó que la progresión de la RD durante el embarazo en mujeres ya diagnosticadas era del 77.5%, y que la progresión a RDP era del 22.5% de esos casos. La aparición de alguna forma de RD en pacientes aún no diagnosticadas de DR fue del 26%. Independientemente de la variabilidad en los distintos resultados, las pacientes embarazadas con DM con o sin RD deben ser estimuladas a lograr un control metabólico adecuado para minimizar los riesgos.

- **Factores oculares:** Moss et al estudiaron la asociación de la progresión de la RD con la presión intraocular (PIO), la presión de perfusión ocular, y la miopía, encontrando que

la PIO elevada estaba estadísticamente asociada a la incidencia aumentada de RD en pacientes con inicio de DM en edad juvenil. La miopía se demostró como factor protector de la progresión hacia RDP (30). Otros factores asociados a una mayor progresión son la oclusión venosa retiniana, la cirugía de cataratas complicada con ruptura de la cápsula posterior, los traumatismos oculares, las uveítis y los tumores intraoculares. Como factores protectores podemos destacar la atrofia del epitelio pigmentario de la retina, la ambliopía y el desprendimiento de vítreo posterior (31).

- **Factores genéticos:** aunque la importancia de la hiperglicemia crónica en la fisiopatología de la RD es evidente, los factores genéticos pueden tener un papel determinante en su desarrollo (véase apartado 1.9. “Herencia y genética en el edema macular diabético”).

4. PATOGÉNESIS DE LA RD Y EL EMD

La RD es una patología que cronológicamente cursa en dos fases bien diferenciadas: En la primera, las estructuras vasculares retinianas sufren un deterioro anatómico y funcional progresivo debido a la hiperglucemia crónica, mientras que en la segunda, se pone en marcha un mecanismo compensatorio que, lejos de ser eficaz, deriva en las complicaciones más graves de la enfermedad.

Dentro de la primera fase, la microvasculatura retiniana se ve afectada por distintas alteraciones bioquímicas, lo que conduce a una alteración del componente plasmático y de la pared vascular, dando como resultado una situación de hipoxia. La hipoxia en el tejido retiniano desencadena mecanismos de compensación, como son la vasodilatación y la vasoproliferación. Como consecuencia de esto, aumenta el flujo y la presión de perfusión en unos vasos sanguíneos que se encuentran ya alterados estructural y funcionalmente, y que no son capaces de responder adecuadamente a estos cambios, perpetuándose y agravándose la situación. Ante el fracaso de este mecanismo de compensación, se desencadena la segunda fase, en la que la vasoproliferación pretende restaurar la oxigenación de los tejidos hipóxicos mediante unos vasos nuevos aberrantes que empeoran drásticamente la integridad anatómica y funcional de la retina (32).

En estas dos fases, se encuentran implicados múltiples factores bioquímicos, fisiológicos, hematológicos, anatómicos e inductores de neovascularización.

4.1 FACTORES BIOQUÍMICOS

Estos cambios se producen como consecuencia de la falta de regulación en el transporte de glucosa al espacio intracelular ante una situación de hiperglucemia crónica. La mayoría de las células en estos casos son capaces de limitar rápidamente el paso de glucosa hacia su interior, pero las células endoteliales retinianas, las células mesangiales del glomérulo renal y las neuronas y células de Schwann de los nervios periféricos de los pacientes diabéticos tienen afectado este mecanismo de regulación. En estos casos, son varias las vías de alteraciones bioquímicas, pero todas ellas conducen a un aumento del stress celular oxidativo, con aumento secundario de la producción de mediadores proinflamatorios y de activación de la microglía:

- **Vía de los polioles:** esta vía desemboca en un aumento de los niveles de sorbitol intracelular y por lo tanto de la hiperosmolaridad intracelular, que implica daño celular. En condiciones normales, la enzima Aldosa-reductasa reduce los aldehídos intracelulares tóxicos a alcoholes inactivos, pero si los niveles de glucosa aumentan, esta enzima los convierte en sorbitol. En este proceso, se consume NADPH, que a su vez es el cofactor fundamental para regenerar los niveles intracelulares de glutatión reducido. Por lo tanto, a la hiperosmolaridad intracelularidad se le añade la disminución de glutatión reducido, con una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo (33).
- **Vía de la glicosilación protéica:** consiste en la reacción no enzimática de la glucosa con las cadenas de aminoácidos de las proteínas, las cuales modifican su función y el metabolismo celular. Las principales alteraciones de este tipo son la glicosilación de proteínas implicadas en la regulación de la transcripción génica, la difusión a la matriz extracelular de proteínas glicadas que alteran la estructura de la matriz, y que a nivel intravascular interaccionan y modifican la estructura de proteínas plasmáticas, con activación secundaria de citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento.

- **Vía de la activación de la protein kinasa C (PKC):** la isoforma beta de la PKC se encuentra crónicamente activada en los tejidos de los pacientes diabéticos. Esta activación conlleva alteraciones vasculares como la hiperpermeabilidad vascular, la neovascularización retiniana, alteraciones en el flujo sanguíneo y disfunción endotelial (33).
- **Vía de la hexosamina:** en condiciones de hiperglucemia, parte de la glucosa-6-fosfato que procede de la glicolisis intracelular se transforma en glucosamina-6-fosfato y luego en Uridin difosfato-N-acetil-glucosamina, la cual reacciona con los residuos serina y treonina de los factores de transcripción generando alteraciones en la expresión génica (34).
- **Vía del estrés oxidativo:** la hiperglucemia genera un aumento en la producción de aniones superóxidos, tanto a nivel mitocondrial como a nivel endotelial. Este aumento reduce los niveles de óxido nítrico (que es un potente vasodilatador), alterando la homeostasis vascular. Este anión, también inhibe la actividad de una enzima clave en la vía glucolítica (GAPDH, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), produciéndose un aumento de los metabolitos previos a la acción de la enzima, los cuales activan todas las vías bioquímicas descritas previamente (32).

4.2 FACTORES FISIOLÓGICOS

- **Deterioro de la autorregulación del flujo sanguíneo:** diversos estudios relacionan la hiperglucemia crónica con cambios en la autorregulación vascular, que es la encargada de asegurar un flujo sanguíneo proporcional y constante a las distintas partes de la retina. Esta autorregulación podría estar regulada por el sistema nervioso autónomo (35). La alteración de este sistema en pacientes diabéticos podría ser la causa de los cambios de

perfusión en determinadas fases de la RD. En un estudio se determinó que en situación de hiperglucemia el flujo macular podría aumentar hasta en un 15%, y en situaciones de hipoxia se incrementaría hasta en un 38%, y los diámetros arteriales y venosos aumentarían en un 8.2 y un 7.4% respectivamente (36).

- **Disminución de la velocidad del flujo sanguíneo:** los factores implicados son la mayor viscosidad de la sangre, la degeneración de los pericitos, la vasoconstricción arteriolar y la dilatación de la red capilar y venular (secundaria probablemente a la respuesta compensatoria frente a la hipoxia) (37).

- **Alteraciones de la pared vascular:** se produce un aumento del coeficiente de rozamiento intravascular con alteración y pérdida posterior de las células endoteliales, un aumento de la permeabilidad vascular con extravasación de distintos componentes sanguíneos, un aumento del grosor con endurecimiento y pérdida de elasticidad. Todo ello produce una falta de control sobre el flujo sanguíneo y la presión intravascular (32).

4.3 FACTORES HEMATOLÓGICOS

- **Aumento de la viscosidad sanguínea:** debido a la viscosidad plasmática condicionada por el aumento de determinadas proteínas cuya síntesis está relacionada con la insulina (como el fibrinógeno y las globulinas) y los niveles más bajos de albúmina, a la agregación y pérdida de elasticidad de los glóbulos rojos y a la agregación plaquetaria relacionada con el fibrinopéptido A2.

- **Cambios en los eritrocitos:** en la diabetes, los eritrocitos sufren un proceso de endurecimiento y pérdida de elasticidad de su membrana generado por la glicosilación no enzimática proteica, que les hace más propensos a la agregabilidad, y menos elásticos, lo cual dificulta mucho su circulación por los capilares retinianos, alterándose en gran medida

esta, y produciéndose fenómenos oclusivos. Estos cambios son mayores cuanto mayor es el grado de RD.

- **Cambios en la coagulación:** en las células endoteliales del paciente diabético se produce una disminución de la liberación del activador tisular del plasminógeno (factor fibrinolítico esencial) y un aumento de los niveles del factor VIII de von Willebrand (que favorece la adhesión y la agregación plaquetaria). También se produce un aumento del Tromboxano B₂, metabolito inactivo del tromboxano plaquetario A₂, el cual es un vasoconstrictor y agregante plaquetario muy potente. El aumento de sus niveles, junto con la mayor agregabilidad de los eritrocitos, va a hacer que se produzcan fenómenos oclusivos vasculares a distintos niveles del árbol vascular retiniano, que dejarán como resultado áreas de isquemia de la capa de fibras nerviosas de la retina (32).

4.4 FACTORES ANATÓMICOS

- **Pérdida de pericitos:** los pericitos son unas células contráctiles que se sitúan en el espesor de la membrana basal del capilar y rodean a las células endoteliales, compensando las presiones transmuralas del capilar. En una retina normal, su relación con las células endoteliales es de 1:1. Cuando esta relación se altera en los pacientes diabéticos, se producen áreas focales de debilidad que son las precursoras de la aparición de los microaneurismas (38).

- **Alteraciones a nivel de la membrana basal capilar:** la membrana basal en pacientes diabéticos se engrosa progresivamente, y posteriormente se vacuoliza y se infiltra de lípidos y desechos celulares. En este proceso se ha implicado a la enzima aldosa reductasa, a través de la vía del sorbitol, a la alteración en la producción de glicoproteínas implicadas en la estructura de la membrana, y a la glicación del colágeno. El

engrosamiento, en definitiva, condiciona una disminución del calibre vascular y una disminución en la difusión de distintas sustancias a través de la pared capilar (38).

4.5 FACTORES INDUCTORES DE NEOVASCUALRIZACIÓN

La aparición de factores inductores de neovascularización se produce como respuesta a la hipoxia que se produce como resultado de la aparición progresiva de áreas de isquemia retiniana secundarias a las alteraciones vasculares expuestas con anterioridad (39). Estos factores son producidos por las células de la retina y son capaces de difundir libremente por el espacio intraocular. Su concentración disminuye hacia la parte anterior del globo ocular, pero es suficiente para poder producir neovasos en el iris o en el ángulo camerular. Los factores angiogénicos se unen a receptores específicos en las células endoteliales de áreas retinianas sanas adyacentes e inducen una serie de reacciones bioquímicas intracelulares que transmiten las señales para activar la replicación celular por mitosis. En este preciso momento es cuando influyen numerosas moléculas como las integrinas, angiostatina, endostatina, y metaloproteinasas, que suponen una potencial diana terapéutica para frenar la neovascularización retiniana (40). La regularización de la situación de hipoxia retiniana motivada por los distintos tratamientos, conlleva una disminución de los factores proangiogénicos.

5. CLÍNICA Y SIGNOS OFTALMOSCÓPICOS DE LA RD

Las lesiones que aparecen en la RD no son patognomónicas, pero su distribución, y el contexto clínico en que se presentan y la historia natural de la enfermedad hace que el conjunto de signos oftalmoscópicos sea altamente específico y fácilmente reconocible.

Podemos dividir la RD en dos fases distintas:

- **No proliferativa:** primera fase, en la que van a predominar signos oftalmoscópicos que traducen un aumento de la permeabilidad vascular secundario a la hiperglucemia crónica, y en menor medida, otros debidos a fenómenos vasculares obstructivos.
- **Proliferativa:** en la que predominarán signos asociados a fenómenos de isquemia y neovascularización.

5.1 LESIONES ASOCIADAS AL AUMENTO DE LA PERMEABILIDAD VASCULAR

- **Microaneurismas:** son la primera manifestación oftalmoscópica de la RD. Se manifiestan como dilataciones saculares de la pared de los vasos, habitualmente capilares venosos y son consecuencia de la pérdida de pericitos y de la consecuente debilidad de la pared vascular secundaria al engrosamiento de la membrana basal y la proliferación de las células endoteliales a nivel de la capa nuclear interna de la retina. Dentro de estas dilataciones, se producen alteraciones del flujo sanguíneo, con un daño de las células endoteliales y un aumento de la adhesividad y la agregación plaquetaria que conduce a la formación de microtrombos y a la descompensación de la barrera hematorretiniana interna, lo cual favorece la extravasación de sangre y exudados lipídicos al espacio extravascular.

En la oftalmoscopia se presentan como puntos rojos intrarretinianos, de tamaño comprendido habitualmente entre las 15 y las 50 micras (figura 1). Se suelen localizar fundamentalmente en el polo posterior y en la zona temporal de la mácula y su número suele ser directamente proporcional a la gravedad de la RD (32).

- **Hemorragias intrarretinianas:** son la consecuencia de la alteración de la permeabilidad vascular capilar, aunque también pueden aparecer tras la ruptura de un microaneurisma. Se presentan como manchas rojas con límites poco definidos (figura 1) con tamaño mayor de 100 micras habitualmente, de forma redondeada cuando se encuentran en las capas plexiforme externa o nuclear interna, o de forma alargada cuando están en la capa de fibras nerviosas. El número de hemorragias aumenta proporcionalmente a la gravedad de la RD (representando un factor pronóstico negativo y la confluencia de un número elevado de hemorragias debe hacer sospechar la presencia de áreas isquémicas (32).

- **Exudados lipídicos o Exudados duros:** representan acúmulos extracelulares de lípidos y lipoproteínas extravasados como consecuencia de la alteración de la permeabilidad vascular y de las alteraciones reológicas intravasculares. En la oftalmoscopia se presentan como depósitos blanco amarillentos de bordes bien definidos, que suelen situarse cerca del polo posterior, en áreas con presencia de microaneurismas (figura 1). Pueden distribirse de forma aislada, agrupados en forma de círculo (circinada) o de estrella, o bien, si son muy abundantes, en forma de placa compacta (32). En otros casos, como aquellos en los que existe comorbilidad con hipertensión arterial o dislipemia descontroladas, los exudados pueden distribirse de forma lineal a lo largo de los grandes vasos de la retina. La localización, el número y la extensión de estos exudados está relacionada con la gravedad del EMD, pero no con la progresión de la RD (41).

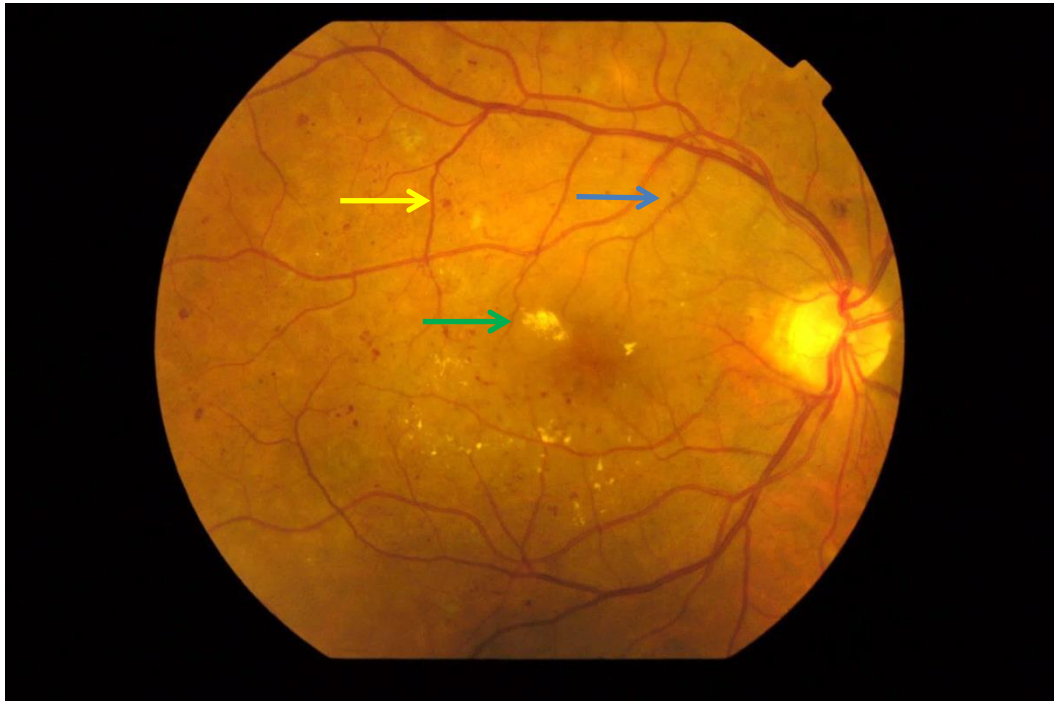


Figura 1: Retinografía en color con signos oftalmoscópicos de RD asociados a hiperpermeabilidad vascular: Microaneurisma (flecha azul); microhemorragia (flecha amarilla); exudados duros (flecha verde).

5.2 LESIONES ASOCIADAS A FENÓMENOS VASCULARES OBSTRUCTIVOS

- **Exudados algodonosos o exudados blandos:** representan material de desecho del flujo axoplásmico que se producen en respuesta a microinfartos a nivel de la capa de fibras nerviosas por oclusión súbita de arteriolas precapilares. En la oftalmoscopia, aparecen como manchas blancas ovaladas, de límites difusos (figura 2) con un tamaño que varía entre 300 y 700 micras (32). Suelen encontrarse cerca del nervio óptico debido a la confluencia de fibras nerviosas a ese nivel. Su número suele ser proporcional al grado de gravedad de la RD, sin embargo no se consideran factor pronóstico debido a que suelen desaparecer espontáneamente en semanas o meses (42).
- **Anomalías vasculares:** pueden ser de dos tipos, pudiendo coexistir ambos:

- **Arteriales:** estenosis, envainamientos y oclusiones.
- **Venosas:** las más frecuentes. Pueden presentarse como dilataciones, duplicaciones, asas vasculares, envainamientos y exudados perivenosos. Pero la forma más habitual de presentación es el arrosariamiento venoso, que alterna estenosis y dilataciones vasculares. Menos frecuentes son las anomalías microvasculares intrarretinianas (AMIR) que aparecen como respuesta a la isquemia focal en forma de canales telangiectásicos con permeabilidad alterada que conectan dos vénulas en forma de asa (43).

Estas anomalías constituyen un indicador muy fiable de hipoxia retiniana y de la existencia de áreas de isquemia. En concreto, los arrosariamientos venosos y las AMIR son uno de los indicadores más fiables de la progresión de la RD hacia formas proliferativas, ya que sugieren una neovascularización presente o inminente (32).

- **Neovascularización:** están formados por células endoteliales que no tienen uniones íntimas entre sí, lo cual les confiere una permeabilidad muy alterada con gran tendencia a dejar pasar la sangre a través de ellos. En fases avanzadas de la enfermedad, estos vasos se asocian a tejido fibroso de soporte (proliferaciones fibrovasculares). Su aparición confirma la presencia de una forma proliferativa de DR, lo cual traduce el estado de falta de perfusión de la retina. Esta isquemia estimula la liberación de VEGF y otros factores angiogénicos, que son los encargados de activar la formación de estos vasos anormales en los territorios venosos (43). Los neovasos suelen estar localizados en los 45° centrales de la retina, habitualmente sobre los vasos peripapilares (neovascularización papilar) o en los límites de áreas no perfundidas o isquémicas de la retina (neovascularización extrapapilar) (figura 2). Se originan en capas internas de la retina, progresando a través de la membrana limitante interna y extendiéndose hacia la hialoides posterior (32). En fases más

avanzadas, las proliferaciones fibrovasculares aumentan su adherencia a la hialoides, ejerciendo un mecanismo de contracción sobre ella que desencadena en ocasiones complicaciones como la hemorragia subhialoidea, o vítrea, y el desprendimiento de retina traccional (44).



Figura 2: Retinografía en color con signos oftalmoscópicos de RD asociados a fenómenos obstructivos:

Exudados algodonosos (flecha amarilla); Neovasos (flecha verde)

6. CLASIFICACIÓN

6.1 CLASIFICACIÓN ETIOLÓGICA DE LA DM (ADA) (45)

- **DM tipo 1 (DM1):** destrucción de las células beta pancreáticas, que normalmente conlleva deficiencia absoluta de insulina.
- **DM tipo 2 (DM2):** déficit progresivo en la secreción de insulina en el contexto de una resistencia aumentada a la insulina.
- **DM gestacional:** diabetes diagnosticada en el segundo o tercer trimestre de embarazo que no cumple criterios posteriores de diabetes.
- **Otros tipos de diabetes** debida a otras causas (por ejemplo defectos genéticos en la función de las células beta (MODY) o en la acción de la insulina, defectos del páncreas exocrino (fibrosis quísticas) o producida por sustancias químicas o medicamentos (tratamientos contra el VIH, o tras trasplante de órganos).

6.2 CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LA RD

La prevención y el manejo de la RD exigen el empleo de criterios homogéneos de clasificación. Aunque hasta el momento presente se han desarrollado varias clasificaciones, la que tiene mayor valor científico y está considerada como patrón de referencia es la establecida por el *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study* (ETDRS) (46). Se trata de una modificación de la clasificación original de *Archie House* empleada para valorar fotografías de fondo de ojo, y se basa en el análisis de imágenes estereoscópicas de 30° de extensión realizadas, con la pupila dilatada, en los 7 campos estándar. Su objetivo fundamental era valorar la gravedad o riesgo de progresión de cada uno de los estadios. El estadiaje se establece en función del tipo y del número de lesiones observadas por comparación con las fotografías estándar propuestas por el ETDRS. Era la clasificación más utilizada en investigación clínica, pero tiene demasiados niveles y requiere comparación constante con fotografías de referencia, por lo que no es fácilmente aplicable a la práctica clínica.

Con la finalidad de conseguir una mejor comunicación entre todos los oftalmólogos, el *Global Diabetic Retinopathy Project Group* (GDRPG) propuso en el 2002 la Escala Internacional de Severidad de la Retinopatía Diabética, basada en los datos del ETDRS, y por su mayor aplicación a la práctica clínica, es la más comúnmente utilizada, y por ello, la que se ha seguido en este estudio (47).

Tabla 1: Clasificación clínica internacional de la RD (GDRPG)

GRADO DE RD	SIGNOS OFTALMOSCÓPICOS
SIN RD	Ausencia de microaneurismas (mA)
RD NO PROLIFERATIVA (RDNP)	
• LEVE	Sólo mA
• MODERADA	mA asociados a < 20 hemorragias intrarretinianas (H) en cada uno de los 4 cuadrantes (C), exudados duros (ED), exudados algodonosos (EA), arrosamiento venoso (AV) en 1 sólo C.
• SEVERA	mA asociados a uno de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> • H severas (>20) en los 4 C • AV en más de 2 C • Anomalías microvasculares intrarretinianas (AMIR) > 1 C
• MUY SEVERA	mA asociados al menos a 2 de los hallazgos anteriores
RD PROLIFERATIVA (RDP)	Neovasos (NV) y/o H prerretiniana o Hemovítreo.

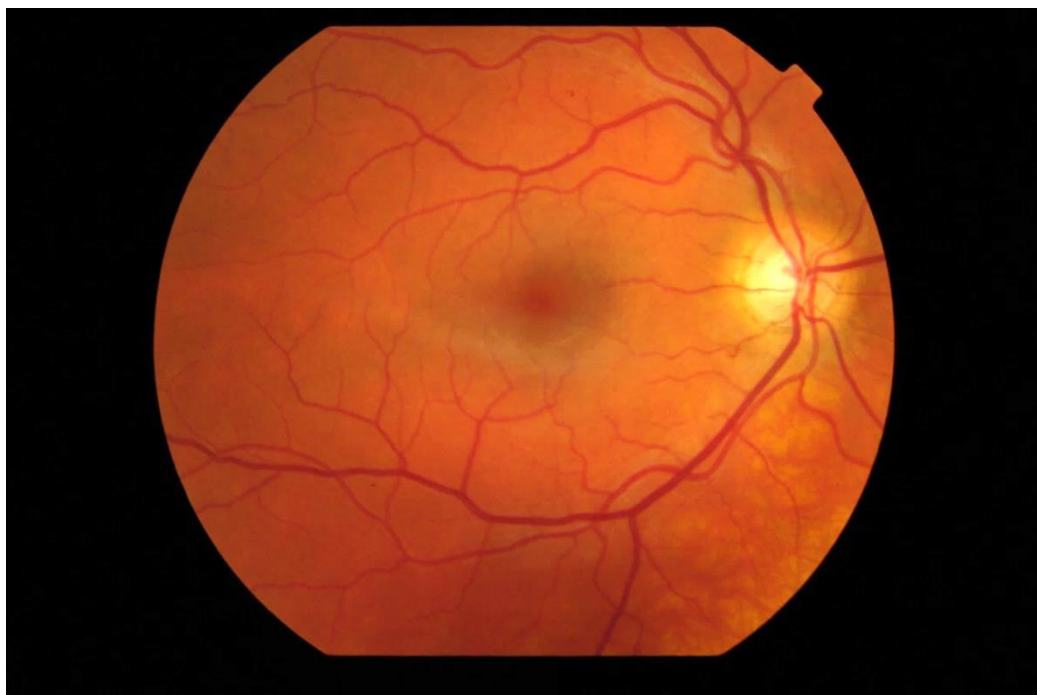


Figura 3: Retinografía en color sin signos de RD.



Figura 4: Retinografía en color con signos de RDNP leve.

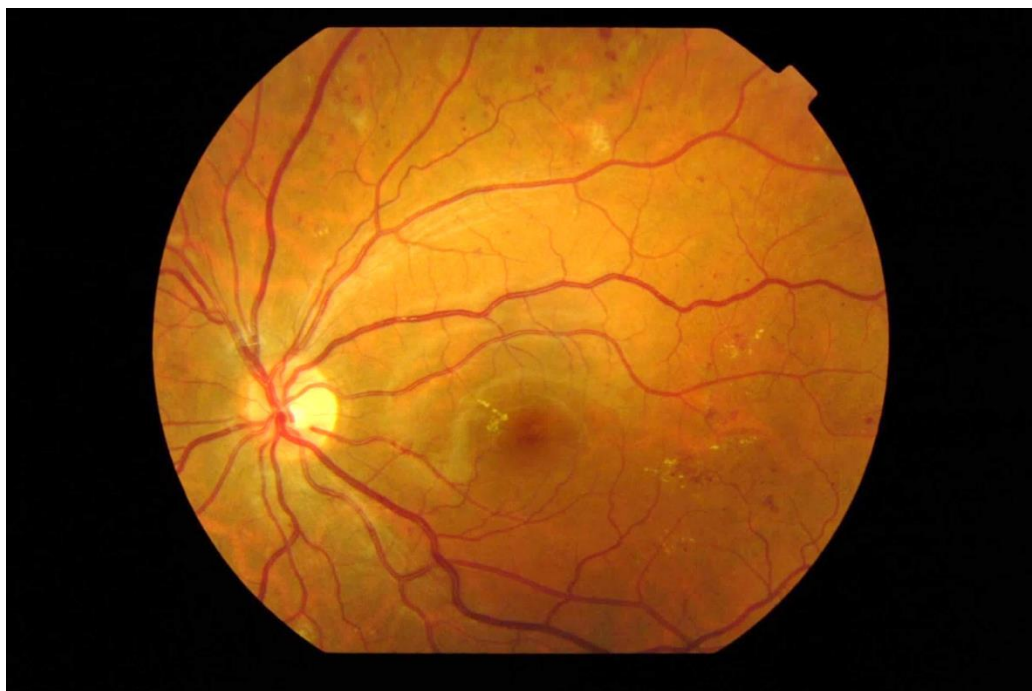


Figura 5: Retinografía en color con signos de RDNP moderada.

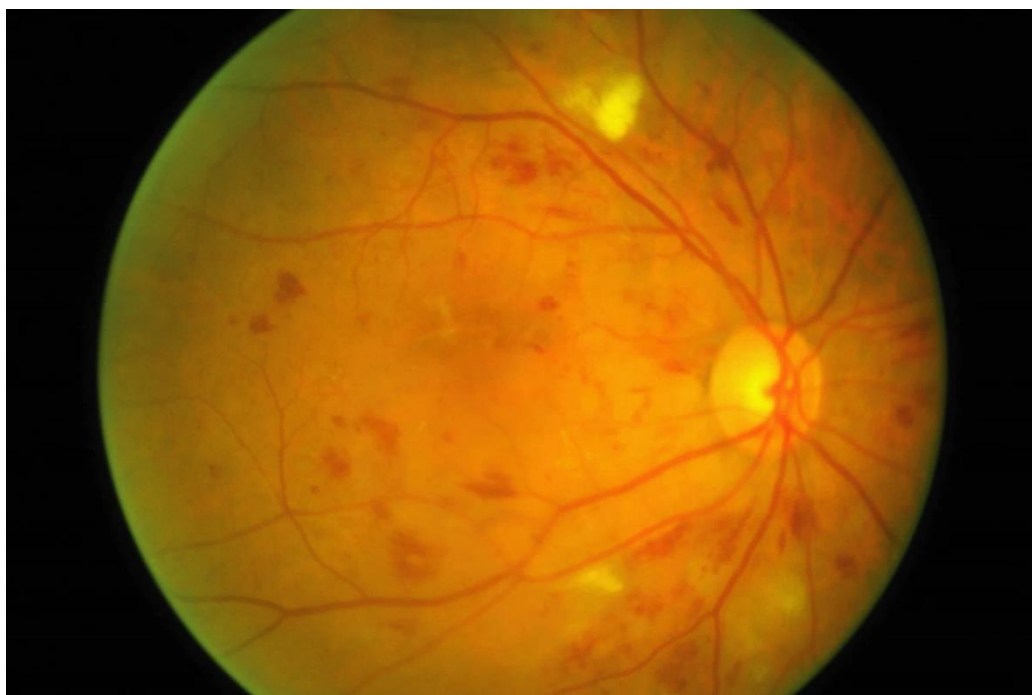


Figura 6: Retinografía en color con signos de RDNP muy severa.



Figura 7: Retinografía en color con signos de RDP

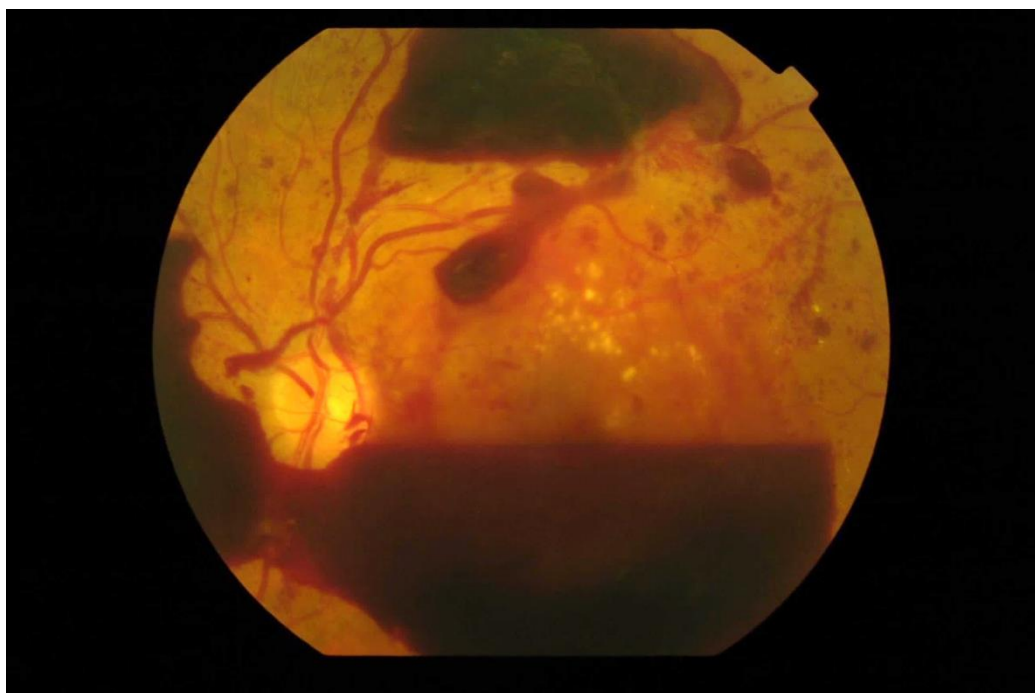


Figura 8: Retinografía en color con signos de RDP y hemorragia prerretiniana y vítrea.

6.3 CLASIFICACIÓN DEL EDEMA MACULAR DIABÉTICO

La clasificación clínica clásica (Tabla 2) se ha ido sustituyendo por otras basadas en técnicas diagnósticas más recientes, como la Angiografía con fluoresceína (AFG) (Tabla 3) y la Tomografía óptica Computerizada (OCT) (Tabla 4).

Tabla 2: Clasificación clínica del EMD

CLASIFICACIÓN CLÍNICA DEL EMD DEL ETRDS (46)
SIN EM
EMCS (Edema macular clínicamente significativo) <ul style="list-style-type: none">• Engrosamiento a menos de 500 micras de la fovea• Exudados duros a menos de 500 micras de la fovea con engrosamiento retiniano asociado• Engrosamiento retiniano > 1 diámetro de disco (DD), parte del cual está a menos de 1 DD del centro



Figura 9: Retinografía en color con signos de EMD clínicamente significativo.

Tabla 3: Clasificación angiográfica del EMD

CLASIFICACIÓN ANGIOGRÁFICA DEL EMD	
EMD FOCAL:	Área bien definida de difusión procedente de microaneurismas (mA) o Área de difusión asociada a mA > 67%
EMD MULTIFOCAL:	Varias áreas de difusión local
EMD DIFUSO:	Área de fluorescencia de difusión tardía > 2 diámetros de disco (DD) con afectación foveal o Área de difusión asociada a mA > 33%
EMD MIXTO:	Coexistencia de EM focal y difuso

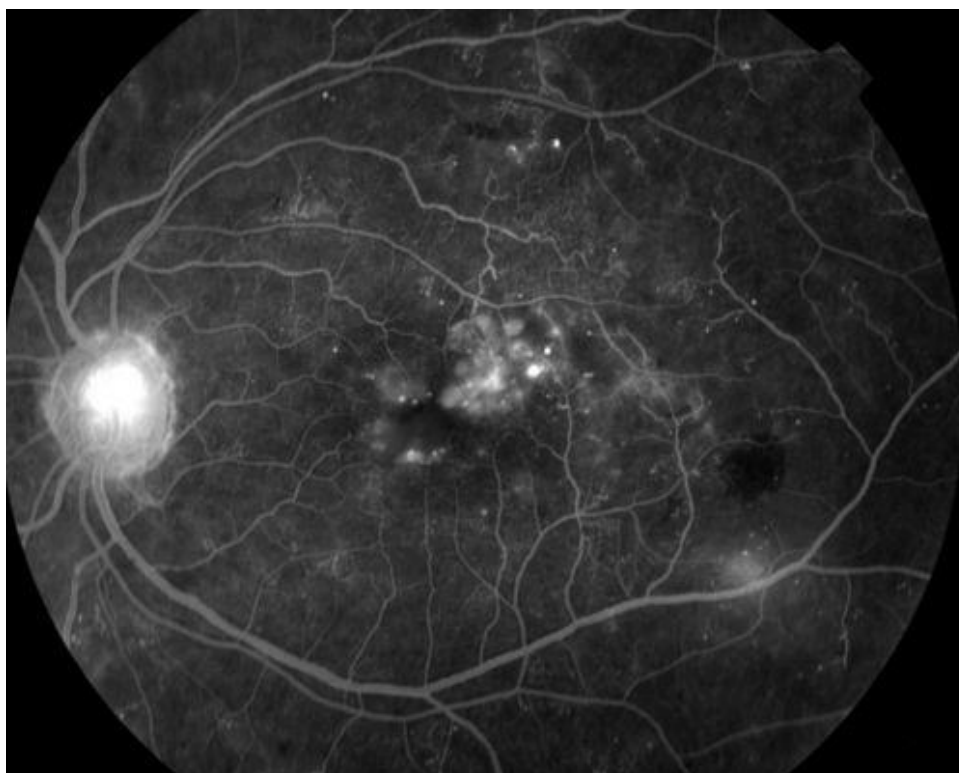
**Figura 10:** Angiografía con fluoresceína con signos de EMD multifocal: se aprecian varios focos de difusión focal de fluoresceína alrededor de la mácula.

Tabla 4: Clasificación del EMD basada en la tomografía de coherencia óptica.

CLASIFICACIÓN DEL EMD BASADA EN OCT (Panozzo et al (48))	
SEGÚN LA MORFOLOGÍA:	
<ul style="list-style-type: none"> • E1: engrosamiento simple que afecta las capas externas de la retina sin espacios quísticos • E2a: de 2 a 4 pequeños quistes • E2b: configuración petaloide o quiste central único grande • E2c: coalescencia de varios quistes, degeneración retiniana quística • E3: desprendimiento del neuroepitelio aislado o asociado a engrosamiento simple o quístico 	
SEGÚN LA TRACCIÓN EPIRETINIANA	
<ul style="list-style-type: none"> • T0: Ausencia de hiperreflectividad epirretiniana • T1: línea continua hiperreflectiva plana sin distorsión evidente de la retina • T2: línea continua hiperreflectiva plana con distorsión evidente de la retina • T3: tracción oblicua o anteroposterior de la mácula 	

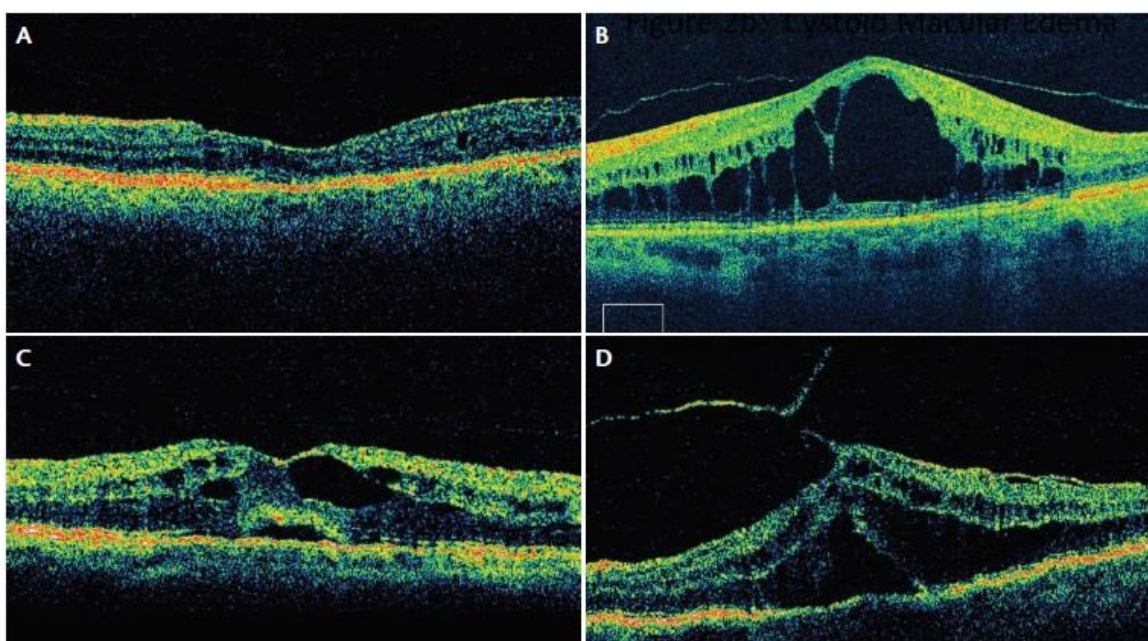


Figura 11: Tomografías de coherencia óptica. A: Engrosamiento esponjoso; B: Engrosamiento quístico; C: Desprendimiento del neuroepitelio asociado a engrosamiento esponjoso y quístico; D: EMD E3 con tracción epirretiniana T3. (Figura extraída de *Imaging Modalities for the Management of DME. What works best and what looks promising for the future.* Yasha S. Modi, MD, and Justis P. Ehlers, MD).

7. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la retinopatía diabética es fundamentalmente clínico, basado en la exploración ocular completa del paciente. Sin embargo, los resultados de diversas pruebas complementarias han ido adquiriendo mayor importancia en el diagnóstico y tratamiento precoz de esta patología.

7.1 EXAMEN OCULAR

- **Medida de la Agudeza Visual:** mediante lectura de letras, figuras u objetos presentadas en optotipos de medición estandarizados.

- **Biomicroscopía anterior:** examen ocular mediante lámpara de hendidura, que permite el estudio de los anejos oculares, el segmento anterior del ojo y el fondo de ojo.

- **Oftalmoscopia:** examen del fondo del ojo realizado, por lo general, bajo midriasis farmacológica obtenida mediante instilación de colirios midriáticos en el fondo de saco conjuntival. Para su realización, se utilizan diversos métodos:
 - Oftalmoscopio: directo o indirecto

 - Lentes de exploración ocular: de contacto o de no contacto. Las últimas son lentes convexas de alta potencia (20, 78, 90 dioptrías,...) diseñadas para obtener un amplio campo de visión del fondo de ojo. Constituyen el método más utilizado en la práctica clínica habitual

7.2 PRUEBAS COMPLEMENTARIAS

- **Retinografía:** consiste en la obtención de imágenes de la retina mediante cámaras fotográficas digitales o analógicas. Se puede realizar en condiciones midriáticas o no midriáticas.

- **Angiofluoresceíngrafía:** consiste en la obtención de imágenes de la retina mediante cámaras fotográficas digitales o analógicas tras la inyección endovenosa de un colorante. Se emplean habitualmente 5 ml de fluoresceína sódica al 10%, que es una sustancia colorante fluorescente que es excitada por una longitud de onda de luz azul de 465 y 490 nm y emite inmediatamente en otra longitud de onda más larga de luz verde amarillento de 520 a 530 nm. La emisión cede al parar la excitación. Un 80% de la fluoresceína se une a proteínas séricas, mientras que un 20% permanece libre en sangre circulante permitiendo la fluorescencia, que es recogida en las imágenes obtenidas. Esta técnica permite un análisis muy preciso de la circulación sanguínea retiniana y una localización precisa de las alteraciones vasculares características de la retinopatía diabética. Sin embargo, al ser una técnica invasiva, no está indicada como prueba de rutina o valoración de base de estos pacientes, y se reserva para casos más concretos (49). Sus principales indicaciones son las siguientes (50): Guía para el tratamiento del edema macular diabético, evaluación de una pérdida de visión inexplicada, búsqueda de neovascularización incipiente y despistaje de pacientes sin o con mínima retinopatía diabética.

- **Ultrasonidos:** la ecografía oftálmica se ha utilizado desde 1956 en el diagnóstico de los trastornos oculares. Su utilización en la RD es rutinario y esencial. Sin embargo, su mayor aplicación está limitada al análisis de casos severos de la enfermedad, especialmente en aquellos en los que no hay transparencia de medios, bien sea por la presencia

de hemorragia vítrea, o por la opacificación de las lentes naturales del ojo, como son la córnea y el cristalino. Por lo tanto, no representa un método diagnóstico principal en el análisis de las fases precoces de la enfermedad. Sus indicaciones principales son las siguientes (51): hemorragia vítrea, desprendimiento del vítreo posterior, proliferación fibrovascular hialoidea anterior, adherencias y tracciones vitreoretinianas, desprendimiento de retina traccional, edema macular, desprendimiento de coroides, preoperatorio de vitrectomía.

- **Tomografía de coherencia óptica (OCT, por sus siglas en inglés):** es una técnica no invasiva, sin contacto, que utiliza ondas de luz para generar, mediante técnicas de interferometría de baja coherencia, imágenes tomográficas de la retina de alta resolución. Es un método simple, rápido, sensible, reproducible, y no invasivo, que permite un análisis preciso de datos anatómicos retinianos, como son el espesor, el volumen y la superficie, así como la detección de desviaciones de la normalidad estructural de la retina, permitiendo el diagnóstico de multitud de patologías vitreoretinianas y de patología del nervio óptico, mostrando un corte tomográfico con imágenes de la mácula cuya resolución se acerca cada vez más al modelo ideal del corte histológico (52). También permite valorar la evolución natural de la enfermedad, la orientación terapéutica más idónea y la monitorización de la respuesta al tratamiento. Por tanto, se ha convertido en la prueba más importante en el manejo de las complicaciones asociadas a la RD. Sus principales limitaciones son las alteraciones que producen opacidades de medios (como las ya mencionadas cataratas, o hemorragias vítreas) y su relativa limitación al polo posterior del ojo, ya que los cortes tomográficos habitualmente disponibles en estos dispositivos suelen abarcar hasta 6 mm de extensión (53). La OCT utiliza un diodo superluminiscente que actúa como fuente de luz y proyecta en la retina un haz luminoso que abarca los 840 nm y barre la retina emitiendo pulsos ópticos cortos dirigidos a un espejo de referencia. La reflectividad obtenida de las estructuras intraoculares a diferentes distancias es comparada con la emitida por

el espejo de referencia y procesada por un detector que envía la información al monitor del ordenador encargado de mostrar la imagen final (figura 12). Las imágenes obtenidas son el resultado de la realización de múltiples medidas axiales en diferentes puntos de un eje transversal. Cada medida longitudinal muestra el comportamiento de una porción de tejido frente a un haz de luz y se expresa en función de la reflectividad presente (figura 13). La alta reflectividad implica un bloqueo parcial o total al paso de luz (exudados duros, fibrosis,...) y la baja reflectividad expresa la poca o nula resistencia al paso de la luz (edema, desprendimientos serosos,...). Las imágenes resultantes se muestran en una falsa escala de color donde el espectro rojo blanco se corresponde con alta reflectividad y el negro-azul a baja reflectividad. (54).

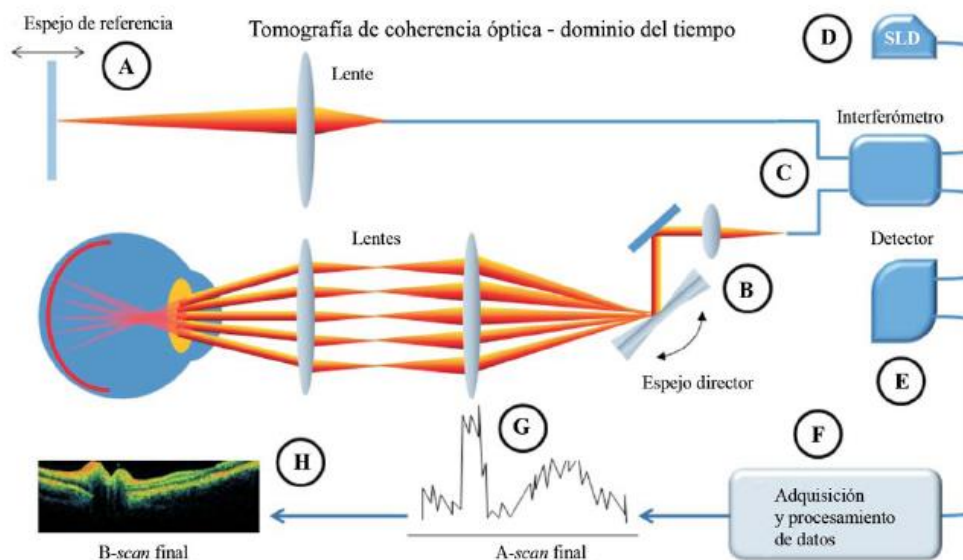


Figura 12: Componentes y funcionamiento de un Tomógrafo de coherencia óptica de dominio tiempo. A: espejo de referencia; B: espejo director; C: Interferómetro; D: Láser diodo; E: Detector; F: Unidad de procesamiento de datos; G: corte tomográfico final axial; H: scan bidimensional final (imagen extraída de <https://examenesespecialesoptometria.wordpress.com>).

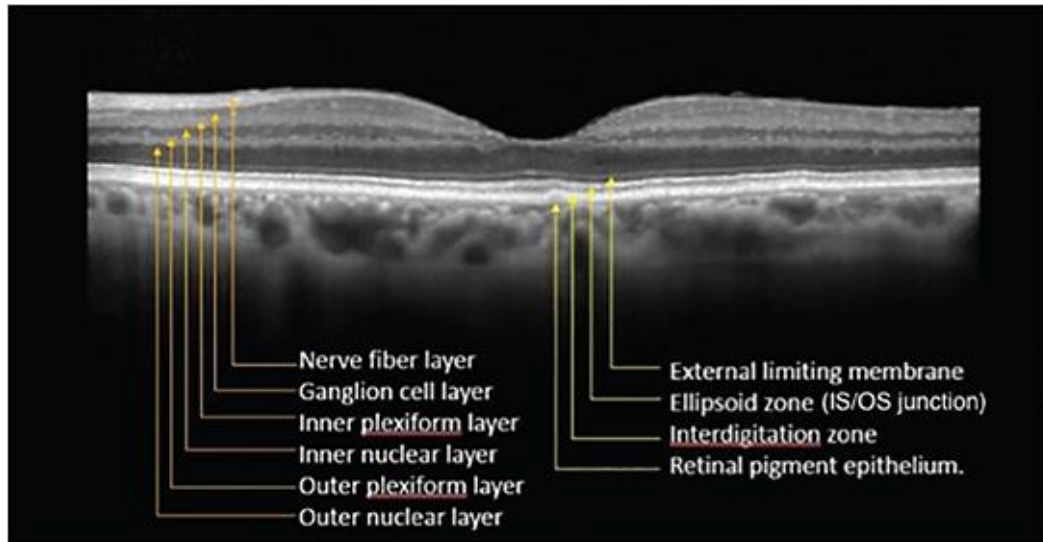


Figura 13: Imagen de OCT macular que muestra las capas de la retina (figura extraída de *Learning to read retinal OCT. Physicians who spend time understanding OCT's lexicon will discover its diagnostic value.* Jessica G. Lee, MD and Richard B. Rosen, MD. July 1, 2015).

- **Tipos de OCT:**

- **De dominio temporal:** obtiene una imagen seccional mediante la medición del tiempo de retardo de la intensidad reflejada y dispersada de la luz. En este caso, en el interferómetro el brazo de referencia tiene un espejo en movimiento que puede ser escaneado en la dirección axial. Dado que la distancia a la que se encuentra el espejo de referencia puede conocerse, podemos localizar la distancia a la que se encuentra la estructura de la retina que ha producido un reflejo que ha coincidido con el reflejo proveniente del espejo de referencia.

- **Dominio espectral (SD-OCT):** obtiene toda la información sin exploración axial a través del tejido, mediante la evaluación del espectro de la interferencia entre la luz reflejada y un espejo estacionario. La longitud del brazo de referencia es fija. Las interferencias se obtienen para diferentes longitudes de

onda simultáneamente y la luz de salida del interferómetro se analiza con un espectrómetro. El espectrómetro resuelve estas interferencias de las diferentes profundidades simultáneamente usando una transformada de Fourier y por último la señal es detectada por un fotodiodo seguido por la digitalización.

- **Swept Source:** esta técnica minimiza la dispersión que crea el epitelio pigmentario, lo que impide la visualización de capas más internas, mediante la utilización de una longitud de onda superior (1050 nm frente a 840 nm en la SD-OCT) para el láser utilizado en esta tecnología, así como la utilización de fotorreceptores en lugar de cámaras CCD. Todo ello conduce a un aumento en la resolución (1 μm). La velocidad de barrido en estos instrumentos es doble que la de la SD-OCT (100.000 A-scan / s en comparación con 50.000 A-scan / seg), lo que permite una mayor rapidez en la adquisición de los B-Scans. Este aumento, es lo que permite visualizar un campo considerablemente más amplio (12 mm frente a 6-9 en la SD-OCT) y una visualización tridimensional del vítreo, la retina y la coroides.

- **Angio OCT (OCT –A):** aprobada por la FDA en 2016, se basa en la diferencia de retrodispersión de la luz que existe entre el tejido neurosensorial y vascular de la retina. Debido a que esta diferencia depende del movimiento intrínseco de los tejidos, y los glóbulos rojos se encuentran en movimiento, las imágenes de OCT – A son básicamente de contraste de movimiento. Estas imágenes de alta resolución aportan información fiable de las estructuras vasculares de la retina, a un nivel próximo a la resolución de un corte histológico, y pueden servir para evaluar múltiples patologías como las telangiectasias, microaneurismas, áreas con déficit de perfusión, o neovascularización capilar,

entre otras muchas, siendo de gran utilidad en enfermedades vasculares como la RD, la trombosis venosa retiniana, la degeneración macular asociada a la edad, o las oclusiones arteriales (56).

- **Tipos de datos obtenidos:**

- **Datos cuantitativos:** basados en la medición del espesor retiniano.

Mediante obtención de datos protocolizada, se realizan 6 cortes tomográficos radiales centrados en fovea. La mácula se divide en 9 sectores incluyendo tres anillos concéntricos y cada uno de ellos divididos en 4 sectores diferentes. Existen 2 diámetros máximos en el anillo externo: 3,45 y 6 mm. En cada sector se mide el espesor medio y se expresa tanto en escala de color como en valor numérico, o en volumen. Estos datos permiten el estudio comparativo en el tiempo de manera automática mediante protocolos de análisis de datos de pruebas obtenidas en distintas fechas, con un alto grado de fiabilidad (52).

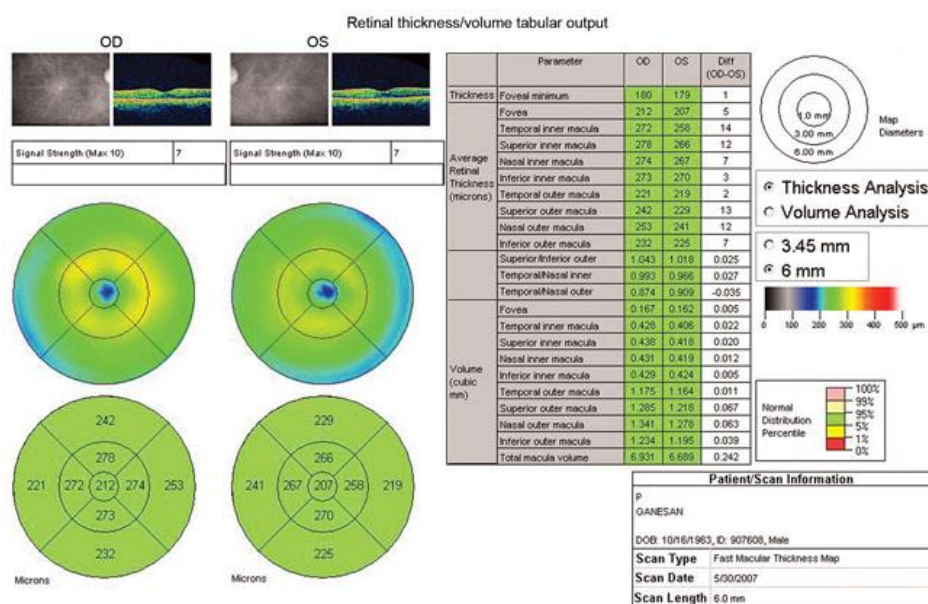


Figura 14: Informe morfológico de grosor y volumen retiniano macular. Stratus OCT 3000 (Zeiss Meditec, Jena-Germany), protocolo de adquisición de imágenes Fast Macular Thickness.

▪ **Datos cualitativos:** relacionados con la estructura anatómica retiniana y su imagen tomográfica. Podemos diferenciar, entre otros signos, exudados duros, hemorragias, fibrosis, tejido prerretiniano fibrogliol, fluido seroso, desprendimientos de retina traccionales, ... En lo referente al edema macular diabético, podemos diferenciar entre los patrones ya descritos previamente en la clasificación del EMD, con los siguientes signos en el corte tomográfico:

- Engrosamiento retiniano tipo simple o esponjoso: zona de hiporreflectividad difusa y homogénea en las capas externas de la retina con aumento de grosor.
- Engrosamiento retiniano cistoide o edema macular quístico: los quistes se presentan como espacios de baja reflectividad circulares u ovoides, divididos por membranas delgadas normorreflectivas (constituidas por células de Müller) que aparecen primero en capas externas de la retina, extendiéndose posteriormente a todo el espesor.
- Desprendimiento neuroepitelial seroso: suele aparecer en fases más crónicas de la enfermedad, en las que la rotura de las paredes de los quistes conlleva el acúmulo de fluido submacular representado como un espacio sin reflectividad por encima de la capa del epitelio pigmentario de la retina.
- Componente traccional: en ocasiones, a cualquiera de los patrones previos se puede añadir la presencia de tracción focal o difusa de la hialoides posterior, de una membrana

epirretiniana, de un engrosamiento de la membrana limitante interna o de la presencia de proliferaciones fibrovasculares, que suelen observarse como bandas hiperreflectantes adheridas a las capas más internas de la retina (52).

8. APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS

El abordaje de la RD requiere de un manejo multidisciplinar, que debe abarcar tanto los factores sistémicos como los propiamente oculares.

8.1 CONTROL METABÓLICO

Las recomendaciones de 2018 de la *American Diabetes Association* (ADA) aconsejan los siguientes niveles de control (57):

- **Control Glucémico:**
 - Hemoglobina glicosilada (HbA1c) < 7%
 - Glucemia capilar preprandial entre 70 y 130 mg/dl y postprandial < 180 mg/dl

- **Control lipídico:**
 - Niveles de colesterol LDL < 100 mg/dl (<70 mg/dl en casos de enfermedad cardiovascular conocida)
 - Niveles de colesterol HDL > 40 mg/dl en varones y > 50 mg/dl en mujeres
 - Niveles de triglicéridos < 150 mg/dl

- **Control tensional:**
 - TA sistólica < 140 mmHg
 - TA diastólica < 80 mmHg

A pesar de estas recomendaciones, el abordaje sistémico del paciente debe ser individualizado, teniendo en cuenta la actitud del paciente y las posibilidades del tratamiento (tendiendo a ser más estricto en pacientes más colaboradores, y más laxos en el caso contrario), los efectos nocivos de una hipoglucemia por control estricto, la duración de la enfermedad (ser más estrictos si el diagnóstico ha sido reciente), la esperanza de vida (a mayor esperanza de vida, mayor control), las comorbilidades y las complicaciones vasculares establecidas (intensificar el control cuando estas no estén presentes, o estén más controladas) y los recursos disponibles y sistemas de apoyo de los que se dispone en el medio.

8.2 TRATAMIENTO OCULAR

Tradicionalmente el tratamiento de la RD se basaba en el tratamiento con fotocoagulación láser. Sin embargo, los resultados en cuanto a ganancia y estabilización de la agudeza visual (AV) eran limitados. Por eso, la aparición de los corticoides de posible uso intraocular supuso una mejoría importante, a pesar de ser transitoria y de ir asociada a un alto porcentaje de efectos adversos. Posteriormente, la aparición de terapias de uso intravítreo que bloquean el factor de crecimiento endotelial vascular han mejorado muy significativamente la tasa de estabilización de la AV, y aún más, la posibilidad de ganancia de AV.

8.2.1 Fotocoagulación con láser: se usan distintos tipos de láser de distintas longitudes de onda, que una vez aplicados suelen ser absorbidos por la retina interna (pigmento xantófilo), la hemoglobina, o la melanina del segmento posterior del ojo. Tiene como efectos adversos, entre otros, la aparición de escotomas paracentrales, la inducción de neovascularización coroidea, el aumento transitorio del edema macular, la fibrosis subretiniana y el crecimiento de las cicatrices del láser a largo plazo. Este tratamiento se

utiliza tanto en el control de la progresión de la RD como en el del EMD, siguiendo las directrices del ETDRS (58):

- Control de la progresión a RDP con panretinofotocoagulación.
- Control del EMD:
 - EMD focal o multifocal: se aplica el láser sobre los microaneurismas que presenten fuga angiográfica entre 500 y 3000 micras del centro de la zona avascular de la fovea.
 - EMD difuso: si no existe tracción, se aplica el láser en patrón de rejilla modificada utilizando impactos de baja intensidad y spot de 50-100 micras.

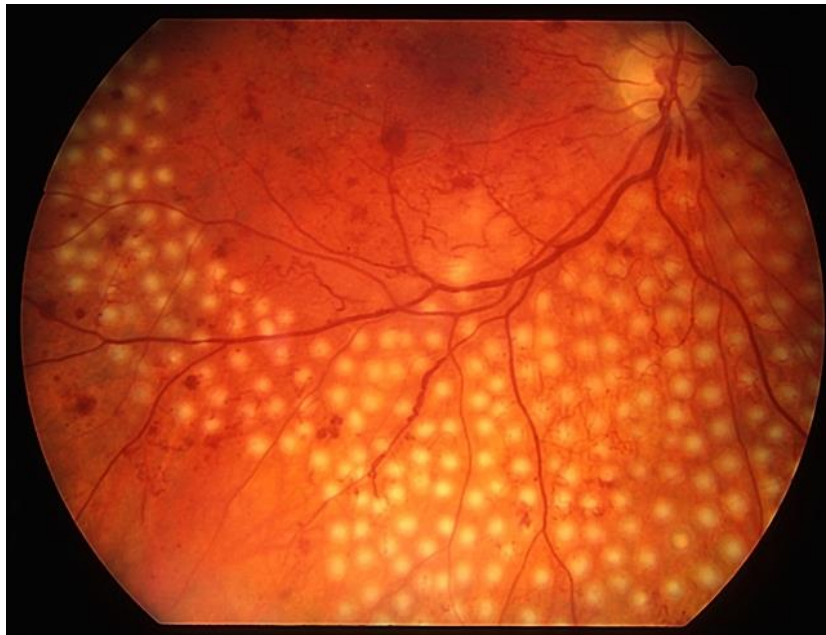


Figura 15: Panretinofotocoagulación incompleta en RDP (imagen extraída de

<https://imagebank.asrs.org/file/5338/prp-laser>).

8.2.2 Tratamiento farmacológico:

- **Corticoides intravítreos:** constituyen uno de los medicamentos disponibles más potentes y efectivos para el tratamiento de la inflamación ocular. Son unos potentes fármacos antiinflamatorios que, dependiendo de la dosis utilizada pueden además suprimir la proliferación celular. Actúan inhibiendo la acción de la fosfolipasa A2, por lo que se inhibe la síntesis del ácido araquidónico, que es el responsable de la síntesis de leucotrienos y de prostaglandinas, los cuales son finalmente el origen de los fenómenos inflamatorios que van a dar lugar a una serie de situaciones patológicas a nivel ocular (vasodilatación capilar, edema retiniano,...) (59). Los corticosteroides pueden ser administrados por diferentes vías, pero cuando se desea que actúen a nivel ocular hay que tener en cuenta que existen dos barreras anatómicas (esto es, la barrera hematoacuosa y la barrera hematorretiniana) que limitan la difusión del fármaco. Sin embargo, cada día disponemos de más información sobre su farmacocinética, lo que posibilita su utilización más correcta, maximiza su eficacia, reduce sus efectos indeseables y amplía sus indicaciones terapéuticas. Sus principales posibles efectos secundarios son el aumento de la incidencia de progresión de cataratas y aumentos de la presión intraocular. Los fármacos disponibles en la actualidad son:
 - Triamcinolona acetónido intravítrea: su eficacia en la reducción del EMD es notable, pero se acompaña de efectos adversos importantes como el desarrollo de cataratas, y el aumento de la presión intraocular (60).

- Dispositivos de liberación prolongada de corticoides: con mayor efectividad y menos efectos adversos. Ozurdex® (dispositivo biodegradable de poliláctico glicólico de liberación de dexametasona durante 4 a 6 meses), e Iluvien® (dispositivo no biodegradable de acetónido de fluocinolona).

- **Terapia antiangiogénica:** en el paciente con RD, los niveles del VEGF se encuentran muy elevados con respecto a pacientes sanos (61). El bloqueo de este factor mediante inyecciones intravítreas ha supuesto una revolución en el control del EMD. Estas inyecciones se administran periódicamente por vía intravítrea, con una media de 8-9 inyecciones en el primer año de tratamiento, 2-3 en el segundo y 1-2 en el tercero, existiendo gran variabilidad al respecto en los múltiples estudios y entre distintos fármacos anti-VEGF. La estabilización visual y la ganancia de letras que se obtiene con estos tratamientos es mucho mayor a la obtenida tanto con láser, como con corticoides, e incluso superior a la obtenida con la asociación de cualquiera de ellos juntos. Actualmente, son varios los fármacos utilizados para tratar el EMD:
 - Lucentis® (ranibizumab): es un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado que fue el primer fármaco aprobado para este uso.

 - Eylea® (aflibercept).

 - Avastin® (bevacizumab): su uso no ha sido aprobado para tratar el EMD, pero se utiliza en calidad de medicamento de uso compasivo en España y muchos otros países.

8.2.3 Tratamiento quirúrgico del EMD: La técnica de la Vitrectomía pars plana (VPP) se usa habitualmente en casos refractarios de EMD, muchas veces como última opción de tratamiento, y en dos casos bien diferenciados:

- EMD difusos con componente traccional: suele ser generado por la presencia de proliferaciones vitreoretinianas, por desprendimientos anómalos del vítreo posterior con tracción vitreomacular, por la presencia de una hialoides engrosada y tensa, o por la presencia de membranas epirretinianas.
- EMD difuso no traccional: en este caso, el tratamiento quirúrgico es más controvertido, obteniéndose buenos resultados anatómicos a corto plazo, pero sin mejoras anatómicas o funcionales a largo plazo.

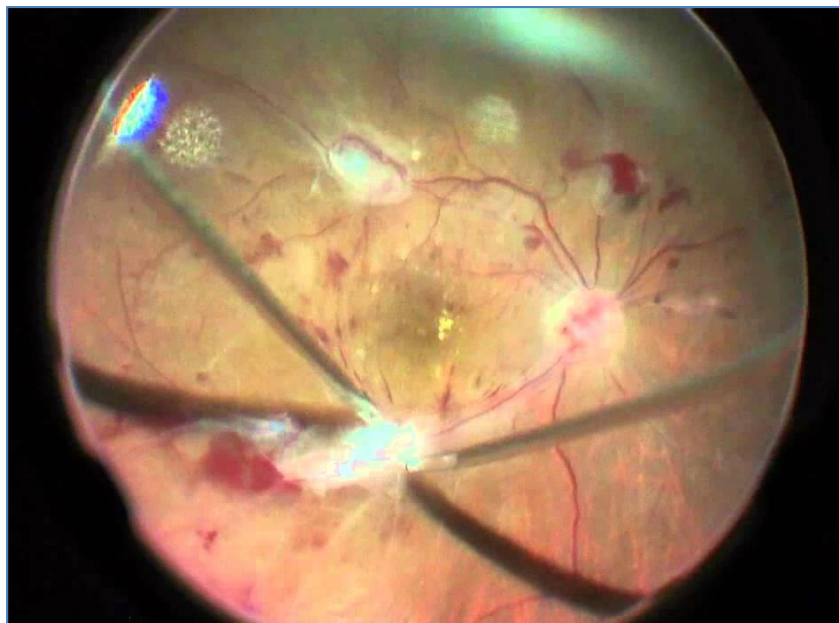


Figura 16. Vitrectomía retinopatía diabética (*25G Vitrectomy in a case of proliferative diabetic retinopathy treated with 360 vitreous truncation and segmentation/delamination.* D.Ruiz Casas)

9. HERENCIA Y GENÉTICA EN LA RETINOPATÍA DIABÉTICA

La duración, la hipertensión arterial y el mal control glucémico son los principales factores de riesgo implicados en el desarrollo de la retinopatía diabética. Por lo tanto, el estricto control de la tensión arterial y de los niveles de glucosa junto con la aplicación de los distintos programas de cribado diagnóstico son los principales métodos de prevención de la enfermedad. Sin embargo, diversos estudios han demostrado variaciones en la aparición y el desarrollo de esta complicación que no pueden ser asociados a estos factores de riesgo (62). Por ejemplo, en el estudio ADVANCE (63), el estricto control metabólico orientado a reducir los niveles de Hemoglobina glicosilada por debajo de 6.5% no demostró una disminución asociada de la incidencia de la RD en un periodo de 5 años. Además, la reducción de la TA hasta niveles casi normales tampoco demostró un enlentecimiento en la progresión de la RD. Aún más interesante es el dato de que pacientes del estudio con mal control metabólico y con cifras tensionales elevadas no llegaron a desarrollar RD. Estos y otros muchos datos sugieren que los factores genéticos pueden jugar un papel determinante en la susceptibilidad personal para desarrollar RD.

La susceptibilidad en la aparición y progresión de la RD también es reflejada por la mayor prevalencia e incidencia en determinados grupos étnicos, como son los africanos, afrocaribeños, surasiáticos, latinoamericanos, y poblaciones tribales, en comparación con poblaciones europeas o relacionadas a estas, a pesar de que estas diferencias no se han encontrado en todos los estudios (64 - 68).

Los factores genéticos podrían participar tanto en la aparición, como en la progresión de la RD. Diversos estudios han detectado variaciones entre el 25 y el 50 % para la RDP que podrían estar asociados a la herencia (69, 70). Otros estudios han encontrado alta concordancia

en el desarrollo de RD en gemelos (68% en DM tipo 1, y 95% en DM tipo2) (71), y en el estudio *Diabetes Control and Complication Cohort* se calculó una odds ratio de 3.1 para el desarrollo de RDNP severa en el caso de tener un familiar diagnosticado de RD (72). Se han encontrado resultados parecidos en otros estudios similares de factores de riesgo.

La RD es un ejemplo de enfermedad genética compleja, a diferencia de enfermedades monogénicas (causadas por único gen, o mendelianas) (73). Generalmente, las enfermedades monogénicas (como son la retinitis pigmentaria, o la enfermedad de Leber) son relativamente infrecuentes y son causadas por la mutación de un único gen que produce el fenotipo característico. Por el contrario, las enfermedades genéticas complejas o poligénicas (como la Degeneración macular asociada a la edad (DMAE) o la RD) suelen ser frecuentes y estar relacionadas con múltiples genes y factores medioambientales.

Con el estudio genético se pretende detectar variantes genómicas asociadas a un mayor riesgo de complicaciones en pacientes con RD, con la esperanza de que la localización y la función de estas variantes señalen genes y vías moleculares que puedan estar implicadas en la etiología de esta enfermedad. Este enfoque genético puede ser muy beneficioso a la hora de detectar a pacientes especialmente susceptibles a desarrollar complicaciones asociadas a la RD, que podrían ser candidatos para tratamiento precoz o preventivo (como en el caso del EMD en nuestro estudio).

En el estudio genético de la RD existen principalmente tres líneas de investigación (74): estudio de genes diana, estudios de asociación familiar y estudios de asociación del genoma completo (GWAS).

9.1 ESTUDIO DE GENES DIANA

Los principales estudios hasta la fecha se centran en el estudio de genes que codifican proteínas implicadas en el desarrollo de la RD o en las vías metabólicas de los polioles, de la formación de productos avanzados de la glicosilación (AGE, *advanced glycosylation end products*) o de la angiogénesis mediada por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) inducida por hipoxia (75). Las líneas más avanzadas se centran en el estudio de las siguientes moléculas: aldosa reductasa, receptor para productos de glicosilación avanzada (RAGE), enzima convertidora de la angiotensina (ECA), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento de endotelio vascular, sintasa del óxido nítrico, endotelina 1, interleucinas, y CD40 (73, 74, 75). En nuestro estudio, analizaremos polimorfismos de genes que codifican las siguientes moléculas:

9.1.1 FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF): es un mediador mitogénico, angiogénico y potente estimulador de la permeabilidad vascular, y ha sido relacionado como un importante factor contribuyente en el desarrollo de la RD. Tanto la hipoxia, como la hiperglucemia estimulan la síntesis de este factor, lo que explica el aumento de sus niveles, y de la expresión de sus receptores en retinas diabéticas (76). El gen que lo codifica se encuentra situado en el cromosoma 6 (6p21.3) y consta de ocho exones y siete intrones. El procesamiento alternativo del RNA genera transcritos que codifican al menos seis isoformas de la proteína, con distinto número de aminoácidos: de 121, 145, 165, 183, 189 y 206 (79). Se han descrito al menos 30 SNPs en el gen que codifica VEGF. Cuatro de ellos son relativamente comunes: -2578A>C (rs699947), -1154G>A (rs1570360) y -634G>C (rs2010963) se localizan en la región promotora; y +936C>T (rs3025039), en la región 3' no traducida (UTR 3') (85, 87). Los alelos -2578A, -1154A y -634G se han asociado a una menor expresión de VEGF (81), y

el alelo +936T a menores niveles de VEGF en sangre. El polimorfismo del gen VEGFA – 2578A>C consiste en un cambio de una adenina (A) por una citosina (C).

9.1.2 SINTASA ENDOTELIAL DEL ÓXIDO NÍTRICO (NOS3): es la molécula encargada de catalizar la formación de la molécula del NO a partir de su sustrato L-arginina, y ha sido implicada en la patogénesis de las complicaciones vasculares de la diabetes (91, 92). El gen se encuentra en el cromosoma 7q36.1 y está constituido por 25 intrones y 26 exones con un tamaño de 21 kb que codifican un mRNA de 4052 nucleótidos (94). Se han descrito muchos polimorfismos de este gen (93-98). El SNP 894G/T (Glu298Asp) (rs1799983) se ubica en el exón 7 del gen de la eNOS, y se caracteriza por un cambio de guanina por timina en la posición 894 del gen (894G>T), y la consecuente sustitución de glutamato por aspartato en el residuo 298 de la proteína eNOS. Algunos estudios recientes muestran que esta sustitución puede producir una metabolización más rápida de eNOS, y cambios en la estructura primaria de la proteína que podrían alterar la funcionalidad de la enzima (98).

9.1.3 ENDOTELINA 1 (ET1): Las endotelinas son una familia de péptidos distintos estructural y farmacológicamente, que ha sido identificada y secuenciada en humanos (7). Se han identificado tres isoformas de la endotelina humana: Endotelina-1, endotelina-2 y endotelina-3 (99). Endotelina 1 es un potente péptido vasoconstrictor compuesto por 21 aminoácidos y producido por las células endoteliales vasculares (7). Aunque la ET1 normalmente está en bajas concentraciones en la sangre, pequeños cambios pueden producir notables efectos tanto locales como sistémicos (102). El receptor de ET1 se expresa en la retina humana y en la cabeza del nervio óptico, lo cual sugiere el importante papel que tiene la ET 1 en el ojo (7). El gen que codifica la endotelina-1 se

localiza en el cromosoma 6 y posee 5.5 kilobases. Contiene 5 exones y 4 intrones. Se han descrito varios polimorfismos de este gen, siendo los más comunes T-1370G, +138/ex1 del/ins, T-37/in2C, 594 G>T. En este último, rs5370, se da la transversión de Guanina a Timina, que se traduce en la sustitución de lisina por asparragina en el aminoácido 198 de la endotelina 1 (Lys198Asn) (7).

9.1.4 INTERLEUCINA 1 BETA (IL1B): La familia de la IL-1 consta de dos IL proinflamatorias, la 1 alfa y la 1 beta, y otra, IL-1Ra, es un antagonista del receptor de IL-1. ILB1 potencia la inflamación y las defensas inmunitarias. También participa en la remodelación tisular y como potente mediador en la inflamación crónica, por lo que se les ha relacionado con la patogénesis de la DM y sus complicaciones. Son segregadas por los monocitos y macrófagos, entre otras células, y se unen al receptor de IL-1 (105). El gen de IL-1 se encuentra situado en el cromosoma 2q 12-21 (106). El polimorfismo -511 C>T (rs16944) se encuentra situado en la zona promotora del gen. Se ha descrito la relación de este polimorfismo con el metabolismo de la glucosa, de manera que el alelo C, englobado dentro de un haplotipo que contiene los polimorfismos 315 C>T (rs114634) e intrón 3 A>G (rs391735) de este gen, se asocia a mayores niveles de glucosa y mayor resistencia a insulina (105).

9.1.5 INTERLEUCINA 4 (IL4): es una citocina hematopoyética que regula parte de la respuesta inmunitaria mediada por linfocitos Th-2 además de estimular a estas células, desencadenando la producción de otras citocinas (106). Produce la conversión de isotipo de células B de Ig-M a Ig- E y estimula la producción de Ig-E en la sensibilización alérgica o durante infecciones, lo cual también se pone de manifiesto en enfermedades como la DM (107). El gen de IL-4 se encuentra en el cromosoma 5q31. La relación de

los polimorfismos de IL-4 con la DM se ha estudiado en varios grupos (106). El SNP -33 C>T (rs2070874) del gen IL4 se localiza en la zona promotora del gen y se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo -523 C>T y un motivo de repetición en tándem (VNTR) localizado en el intrón 3 formando el haplotipo productor de IL4 (Nakashima et al., 2002). El alelo T de la variante -33 se asocia a una mayor producción de la citoquina y está relacionado con mayor susceptibilidad a algunas enfermedades como el asma y las alergias, mientras que ofrece protección frente a enfermedades autoinmunes mediadas por Th1, como la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide (108).

9.1.6 INTERLEUCINA 6 (IL6): es una citocina segregada por las células implicadas en la respuesta inmunitaria, y por otras presentes en el tejido adiposo y en los músculos, y regula la respuesta inflamatoria (109,110). El efecto directo de la IL-6 se centra en la homeostasis y metabolismo de la glucosa, mientras que también puede actuar indirectamente sobre los adipocitos y las células beta pancreáticas (111). El gen de la IL-6 se halla situado en el cromosoma 7p15-p21. La expresión del mRNA de IL-6 se ha relacionado con la resistencia a la insulina, y los niveles de IL-6 también se han relacionado con la DM2 (112, 113, 114). Los SNPs promotores de IL-6 se han considerado en otros estudios como factores de riesgo de DM2 (115-119). El polimorfismo -174 G>C (rs1800795) del gen IL6 se ha estudiado para valorar su influencia en la susceptibilidad a diabetes y en el desarrollo de nefropatía y retinopatía. Se ha sugerido que los pacientes diabéticos tipo 1 portadores del genotipo GG podrían ser menos susceptibles al desarrollo de retinopatía y nefropatía.

9.1.7 INTERLEUCINA 8 (IL8): es producida por diversos tipos celulares, como las células endoteliales, epiteliales, o los macrófagos, en respuesta a estímulos inflamatorios, y desarrolla una potente actividad quimiotáctica (14). En concreto, potencia la inflamación e induce la angiogénesis uniéndose a su receptor desencadenando vías de señalización molecular (120, 121, 122). Se han encontrado niveles elevados de IL-8 en la retina y el vítreo de pacientes diabéticos, y se cree que contribuyen a la progresión hacia la forma proliferativa de la RD (123). El gen de IL8 se localiza en el cromosoma 4, en la posición q12-13. El polimorfismo más estudiado del gen IL8 es el cambio de adenina por timina en la posición -251, en la zona promotora de la proteína (rs4073). El alelo A está asociado a una mayor producción de la proteína y se relaciona con un incremento del riesgo de padecer nefropatía en diabéticos. El gen IL8, y más en concreto el polimorfismo -251, se ha relacionado con las complicaciones derivadas de la diabetes como la nefropatía y retinopatía diabética, de manera que el verdadero efecto de esta citoquina puede estar más relacionado con la predisposición a las complicaciones de la diabetes que a la diabetes en sí.

9.1.8 CD40 (*cluster of differentiation 40*): forma parte de la amplia familia de receptores de TNF. Se expresa principalmente en linfocitos B, linfocitos T y células presentadoras de antígenos, aunque también se encuentra presente en otros tipos celulares, como células endoteliales y células ductales del páncreas (124). CD145 es un ligando de CD40 presente en células T CD4+ y en plaquetas, además de en el plasma. La interacción entre CD40 y CD145 regula la inmunidad celular y humoral, y activa la inflamación. Esta interacción se ha relacionado con el desarrollo de arteriosclerosis, con el rechazo de trasplantes y con distintas alteraciones autoinmunitarias (125). El gen CD40 se localiza en el brazo largo del cromosoma 20, en la posición q12. La variante -1C>T (rs1883832)

del gen CD40 se localiza en la secuencia conservada Kozak y estudios funcionales sugieren que el genotipo TT reduce hasta en un 39% la expresión de CD40 (127).

9.2 ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN FAMILIAR

Este tipo de estudios se centran en el análisis genético de personas enfermas y sanas de una misma familia, partiendo de la base de que el número de diferencias en el ADN entre familiares es menor que entre personas no emparentadas, aumentando la probabilidad de detectar la mutación causante.. Por ejemplo, en uno de los primeros estudios relacionados con la DM realizados, se analizó el genoma de gemelos con RD, encontrando una concordancia del 68% en DM tipo 1 y del 95% en DM tipo 2, pero no se detectaron regiones genómicas específicas compartidas por miembros de una misma familia (128).

9.3 GENOME WIDE ASSOCIATION STUDIES (GWAS)

Los estudios de asociación del genoma completo representan una nueva herramienta para identificar genes candidatos. Consiste en la evaluación masiva de SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) basándose en la propiedad del desequilibrio del ligamiento (128), un fenómeno por el que polimorfismos adyacentes se relacionan entre sí por su co-segregación de una generación a otra (128). Los GWAS comparan entre poblaciones las frecuencias con las que se presentan variantes genéticas distribuidas a lo largo del genoma, con el objetivo de determinar si existen diferencias en dichas frecuencias que puedan estar relacionadas con la enfermedad o rasgo que diferencia ambas poblaciones (128). Una vez una variante genética muestra diferencias entre controles y pacientes para una enfermedad, debe evaluarse su potencial

contribución a la misma. En el caso de localizarse en una región de ADN que codifica para una proteína, su posible repercusión funcional es más fácil de determinar, en tanto puede afectar a su estructura o actividad. No obstante, cuando la variante genética se localiza fuera de las regiones codificantes, aumenta la dificultad para determinar si interviene, o cómo interviene en la enfermedad (129). Utilizando datos de dominio público como la base de datos genéticos HapMap, y las nuevas tecnologías de *DNA arrays*, o chips de DNA, varios cientos de miles de SNPs seleccionados pueden ser estudiados en un único ensayo (128). Aun así, los GWAS tienen sus limitaciones. Los chips de DNA comercializados para este uso proporcionan excelente cobertura para SNPs comunes, pero tienen poco potencial para detectar variantes raras infrecuentes (130, 131).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Es objeto de este estudio analizar las características demográficas y clínicas de una muestra de pacientes diabéticos tipo 1 bien controlados, en ausencia de comorbilidades significativas, sin RD o con RD de bajo grado, así como su evolución a lo largo de diez años, con especial atención a los cambios en el grosor retiniano central medido con OCT. Se analizarán las relaciones de estos cambios de grosor con los polimorfismos de determinados genes que codifican moléculas implicadas en la patogenia de la enfermedad para poder determinar si la presencia o no de determinadas variantes génicas puede determinar una mayor o menor susceptibilidad al desarrollo precoz de engrosamiento retiniano. Conocer esta susceptibilidad puede ser de gran ayuda para poder establecer las estrategias de abordaje diagnóstico y terapéutico precoz que mitiguen el devastador impacto socio-sanitario de esta patología ocular.

Consideramos que la incidencia y la progresión de la RD en una muestra de pacientes DM 1 de nuestra área de salud con buen control de la enfermedad es menor en la actualidad, en comparación con las estimaciones globalmente aceptadas por los estudios de referencia, gracias a las mejoras en el control metabólico de los pacientes, especialmente con el uso de nuevas terapias intensivas de insulina (bombas de infusión). Los estudios que han sido mundialmente aceptados y utilizados en la práctica clínica habitual con la finalidad de establecer pronósticos de la enfermedad, diseño de programas de cribado, pautas de seguimiento y tratamientos preventivos pueden haber dejado de ser de referencia actual dado el mejor control oftalmológico de la RD.

Las nuevas tecnologías de imagen tomográfica de coherencia óptica (OCT) son capaces de detectar cambios de grosor retinianos previos al diagnóstico de EMD clínicamente significativo. También pueden detectar aquellos sectores maculares que se afectan más frecuentemente en esta fase de la enfermedad. Es posible relacionar estos cambios con los distintos polimorfismos de genes que codifican moléculas implicadas en la patogenia de la RD.

1. HIPÓTESIS

- Los pacientes de nuestra área de salud tienen un mejor control metabólico y una menor progresión de su RD en comparación con los datos de estimación reflejados en estudios clásicos de referencia.
- Los SNP de los genes NOS3, ET1, VEGF, IL1B, IL4, IL6, IL8 y CD40 pueden estar relacionados con variaciones interindividuales del grosor retiniano central en el desarrollo subclínico de edema macular diabético y pueden modificar la susceptibilidad de desarrollar EMD.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- Estudiar si el riesgo de desarrollar EMD o aumento del grosor retiniano subclínico puede verse modificado por la presencia de variantes en los genes que codifican para eNOS, ET1, VEGF, IL1B, IL4, IL6, IL8 y CD 40 en los individuos de una muestra de pacientes de nuestra área de salud con DM 1 bien controlada, y con ausencia o bajo grado de RD.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar epidemiológica y clínicamente una serie de pacientes DM1 de nuestra área de salud tras seguimiento de 10 años y comparar estos resultados con los disponibles en la literatura científica que han servido como referencia en la predicción de la evolución de la enfermedad.

- Determinar la distribución de genotipos de los polimorfismos de los genes NOS3, ET1, VEGF, ILB1, IL4, IL6, IL8 y CD40 en los individuos de la muestra.

- Estudiar la asociación estadística entre los distintos genotipos y las características clínicas de los pacientes de la muestra con especial atención al aumento de grosor retiniano desarrollado a lo largo del estudio.

PACIENTES Y MÉTODOS

1. PACIENTES

1.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

En el 2008, tras obtener su consentimiento informado, fueron incluidos en el estudio 175 pacientes con DM tipo 1 diagnosticada por el Servicio de Endocrinología, Unidad de Diabetes, del Hospital Clínico Universitario de Salamanca, siguiendo los criterios del 2007 de la Asociación Americana de Diabetes (ADA). 79 pacientes completaron el período de seguimiento de diez años.

1.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

Fueron excluidos aquellos pacientes con patología ocular que imposibilitaba el estudio de las variables previstas:

- Pacientes ya tratados previamente por el EMD
- Pacientes cuyos medios oculares no eran transparentes e impedían el estudio del fondo de ojo (cataratas, leucomas corneales,...)
- Pacientes con patologías oculares retinianas concomitantes
- Pacientes con RDNP severa, muy severa o RDP
- Pacientes que no pudieron completar el seguimiento (mayoría de los excluidos).

2. DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio descriptivo y observacional prospectivo de cohorte.

3. MÉTODOS

3.1 MÉTODOS EMPLEADOS EN EL ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO

En el periodo 2008-2018, se llevó a cabo la recogida de datos y la estandarización de los distintos análisis y exploraciones clínicas configurando una base de datos clínicos generales, endocrinológicos de control metabólico, y oftalmológicos de las variables a considerar en el estudio.

- **ESTUDIO ENDOCRINOLÓGICO:** DM tipo 1 diagnosticada siguiendo los criterios de ADA 2007.
 - Datos demográficos y de anamnesis (principalmente edad, sexo, fecha de nacimiento, nombre, patología concomitante como hipertensión arterial, dislipemia, tabaquismo, disfunción tiroidea)
 - Datos relativos a la DM tipo 1 (año de diagnóstico, años de evolución, años entre el diagnóstico de la DM y la RD, presencia o ausencia de microalbuminuria, nefropatía, neuropatía, trasplante renal, cifras máximas, mínimas y actuales de hemoglobina glicosilada)
 - Se conservaron muestras para el análisis genético objeto de estudio y para determinaciones de somatomedina C, IGFBP3, Proteína C reactiva y ECA.

- **ESTUDIO OFTALMOLÓGICO:** Se recogieron los siguientes datos:
 - Agudeza visual medida con optotipos Snellen

- Presión intraocular medida con tonómetro de Perkins.

- Estudio de Biomicroscopía anterior convencional con lámpara de hendidura.

- Fondo de ojo, analizado con lentes de +20 y +90 dioptrías, y dejando constancia en aquellos casos con algún grado de RD mediante retinografías.

- Grado de RD: se utilizó la Escala Internacional de Severidad de la Retinopatía Diabética del *Global Diabetic Retinopathy Project Group* (GDRPG) expuesta en la Introducción, en el apartado 6.2. Clasificación clínica de la RD (Tabla 1).

- Presencia o ausencia de EMD: Se utilizó la Clasificación del EMD basado en OCT expuesta en la Introducción, en el apartado 6.3. Clasificación del edema macular diabético (Tabla 4), para diferenciar dos categorías simplificadas:
 - Ausencia de EMD: sin signos tomográficos de EMD.

 - Presencia de EMD: presenta cualquier grado de EMD.

3.2 MÉTODOS EMPLEADOS EN EL ANÁLISIS TOMOGRÁFICO

- **TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA:** cada dos años, durante un periodo de seguimiento de diez años, un solo investigador recogió los datos de grosor retiniano medidos en micras en el área macular de los dos ojos de cada paciente, en los sectores correspondientes a los dos círculos concéntricos externo e interno (superior, nasal, inferior y temporal), así como central (*central subfield thickness* CSF). Se utilizaron para el análisis final únicamente los grosores centrales y los del círculo concéntrico interno (correspondiente a los 1-3 mm perifoveales) al inicio y al final del estudio. Siempre se utilizó el mismo equipo de OCT, un Stratus OCT 3000 (Zeiss Meditec, Jena-Germany), y un protocolo de adquisición de imágenes *Fast Macular Thickness*.

3.3 MÉTODOS EMPLEADOS EN EL ANÁLISIS GENÉTICO

3.3.1 Aislamiento del ADN de alto peso molecular:

- Obtención de muestras de sangre periférica mediante venopunción antecubital y extracción de 10 ml de sangre. Conservación de la muestra a 4°C hasta su procesamiento.
- Obtención de células mononucleadas de sangre periférica: Aislamiento de células nucleadas mediante lisis eritrocitaria con solución hipotónica y centrifugación repetida (centrifugación de la sangre total en 50 ml de agua destilada ddH₂O (*double distilled water*) durante 30 minutos, 1500 rpm, a 4°C). Lavado de células mononucleadas en tampón Fornace (0,25 M; Sacarosa; 50 mM Tris-HCL pH 7,5; 25 mM KCL; 5 mM MgCl₂) tras recuperación de la interfase. Centrifugación a 580 g durante 20 minutos para

precipitación celular. Resuspensión del botón de células nucleadas obtenido de nuevo en tampón Fornace a una concentración estimada de 5×10^6 células/ml. Incubación a 55°C durante 8-16 horas de la muestra.

- Purificado de ADN con fenol y cloroformo.
- Aislamiento del ADN total de alto peso molecular: adición de EDTA (ácido etilendiamino-tetraacético, concentración final 10 mM) a la muestra previa para inactivación de las nucleasas, SDS (Dodecil sulfato sódico, concentración final 1%) para romper las membranas celulares y Proteinasa K (Boehringer Mannheim, concentración final $50 \mu\text{g/ml}$) para degradar las proteínas. Incubación de esta muestra a 55°C durante 8-16 horas.
- Purificación del ADN: purificación del ADN mediante extracción con fenol-CIAA (cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 v/v) y centrifugado durante 10 minutos a 1800rpm. Recuperación de la fase acuosa sobrenadante superior con el ADN en solución, evitando la interfase proteica, y adición del mismo volumen obtenido de fenol-CIAA. Nueva centrifugación a 1800 rpm durante 10 minutos. Recuperación de la fase acuosa, precipitación del ADN en solución mediante la adición de 2,5 volúmenes de etanol absoluto al 100% frío (-20°C). Lavado del ADN extraído con etanol al 70%. Nueva centrifugación a 16600 g, y evaporación del etanol residual. Disolución del ADN en 200 μl de ddH₂O estéril.
- Cuantificación del ADN: estimación de la concentración y el grado de contaminación proteica del ADN tras medir su absorbancia a 260 y 280 nm, respectivamente, en espectrofotómetro automático Nanodrop ND2000 (*Thermo Fischer Scientific*). Almacenamiento de la muestra de ADN obtenida, con una concentración aproximada de 1000-1500 $\mu\text{g/ml}$, en tubos *Eppendorf*® a -20°C , para evitar tanto la degradación progresiva del DNA como su posible contaminación por microorganismos.

3.3.2 Amplificación de fragmentos de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

- Reacciones de amplificación con los productos comerciales PCR SuperMix (Gibco-BRL) y PCR MasterMix (Promega). Se emplearon 1 µl y 4 µl de la mezcla de los dos oligonucleótidos flanqueantes (sentido:*forward* y anti-sentido:*reverse*) y 1 µl del ADN obtenido por el método anteriormente descrito a concentración 0,1-0,2 µg/ml.
- Control de contaminación mediante una reacción conteniendo todos los reactivos antes citados excepto el ADN molde.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador automático *Life Technologies-Invitrogen* y la manipulación post-PCR se llevó a cabo en un laboratorio distinto de donde se realizó el aislamiento y amplificación del ADN.

3.3.3 Discriminación alélica de polimorfismos:

- **Discriminación alélica mediante digestión con endonucleasas de restricción** (132, 134). El estudio de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction fragment length polymorphism* o RFLP) es una técnica que permite discriminar distintos alelos de un gen analizando el tamaño de los fragmentos generados tras la digestión del ADN con enzimas de restricción. Estas enzimas, como por ejemplo, las endonucleasas son capaces de reconocer una secuencia específica de nucleótidos dentro de una molécula de ADN y escindir la cadena de ADN en ese punto concreto, llamado sitio o diana de restricción.

- Digestión enzimática tras incubar 10 µl del producto de PCR con 1 µl de la endonucleasa de restricción seleccionada, *SmaI* (Fermentas), utilizando un tampón de digestión específico para la endonucleasa durante 6 horas a una

temperatura de 30°C. Posteriormente, colocación de las muestras incubadas en un termociclador.

- Separación de los fragmentos obtenidos tras la digestión mediante electroforesis en geles de agarosa al 2,5% (Gel Company Inc.), preparados con tampón TBE (Tris 0,044 M, ác. bórico 0,044 M, EDTA 1mM, pH 8,3) y teñidos con SYBR® Safe DNA Gel Stain (*Life Technologies-Invitrogen*). La electroforesis se llevó a cabo con una diferencia de potencial constante de 120 voltios durante 30 minutos.
- Monitorización de la migración del ADN en el gel mediante la inclusión de dos colorantes en la solución digerida de carga: xileno-cianol (Bio-Rad) y azul de bromofenol (Bio-Rad). Inclusión en todos los geles de un marcador de tamaño, correspondiente con el ADN del fago Φ X-174 cortado con la endonucleasa HaeIII.
- Tras la electroforesis, visualización de los fragmentos en el gel de agarosa gracias a SYBR® Safe, que actúa intercalándose entre las bases nitrogenadas del ADN y emitiendo fluorescencia al ser expuesto a la luz ultravioleta (254 nm). Almacenamiento de los resultados obtenidos mediante un sistema de fotografía digital (Kodak DC40) acoplado a un programa informático de tratamiento de imágenes (*Kodak Digital Science 1D*).
- **Discriminación alélica mediante PCR con sondas TaqMan:** Técnica basada en la actividad de la Taq polimerasa, enzima exonucleasa 5'-3' que actúa escindiendo una sonda marcada ya hibridada a la secuencia diana, liberando a su vez un fluoróforo, que es detectado por un lector de fluorescencia, en cantidad directamente proporcional a la acumulación de ADN sintetizado durante los ciclos de PCR (132). La sonda TaqMan está formada por un fluoróforo unido covalentemente al extremo 5' de un

oligonucleótido, y un desactivador de fluorescencia (*quencher*) en el extremo 3', y está diseñada para hibridar con una región específica de ADN que será amplificada por un par de oligonucleótidos específicos (134). Se trata de una técnica de PCR cuantitativa que garantiza la cuantificación y la especificidad de la detección de genes, y la identificación de SNPs o mutaciones puntuales. Se pueden usar diversas sondas marcadas con distintos fluorocromos para identificar los diferentes alelos descritos en cada uno de los genes estudiados. En el estudio, los fluorocromos empleados fueron sondas VIC y FAM (Tabla 5). En caso de detección de ambas fluorescencias, es indicativo de heterocigoto. La reacción de amplificación se lleva a cabo en un termociclador automático, que dispone de varios canales de lectura y permite detectar la emisión de distintos fluorocromos a la vez, siguiendo el mismo esquema para los distintos SNP:

- Realización del sustrato en placa de 96 celdas con:
 - 5 µlitros del compuesto comercial que proporciona la DNA polimerasa Taq.
 - 0,25 µlitros del compuesto comercial que contiene el oligonucleótido cebador, *primer forward*, el oligonucleótido cebador, *primer reverse*, y las sondas marcadas con fluorocromo de VIC y FAM.
 - 4,25 µlitros de agua destilada.
 - 0,5 µlitros = 5 ng de ADN (concentración 10-20 µg/ml).
 - Como control se rellenan cuatro celdillas de cada placa con el mismo sustrato sin ADN.
- Fases del programa: Colocación de la placa en el termociclador *StepOne Real Time PCR de Applied Biosystems®*

- Análisis de la detección de fluorescencia mediante una representación gráfica en la que se muestran los resultados de la discriminación alélica realizada y su distribución en nuestro grupo de pacientes y controles (133).

Tabla 5: Secuencia de las sondas utilizadas en los genes de estudio. Los nucleótidos marcados con las diferentes sondas se resaltan en negrita.

GEN	SONDA VIC	SONDA FAM
NOS3	CCCCAGATGATCCCCCAGA A CTC	CCCCAGATGAG G CCCCCAGA A CTC
ET1	TTCATGATCCCAAGCTGAAAGGCA A GCCCTC CAGAGAGCGTTATGTGACCC	TTCATGATCCCAAGCTGAAAGGCA A TCCCTCCA GAGAGCGTTATGTGACCC
VEGF	GCCAGCTGTAGGCCAGACCCTGGCA A GATCT GGTGGATAATCAGACTGAC	GCCAGCTGTAGGCCAGACCCTGGCA C GATCTG GGTGGATAATCAGACTGAC
IL1B	TACCTTGGGTGCTGTTCTCTGCCTC G GGAGC TCTCTGTCAATTGCAGGAGC	TACCTTGGGTGCTGTTCTCTGCCTC A GGAGCTC TCTGTCAATTGCAGGAGC
IL4	TTAGCTTCTCCTGATAAACTAATTG C CTCACA TTGTCACTGCAAATCGACA	TTAGCTTCTCCTGATAAACTAATTG T CTCACATTG TCACTGCAAATCGACA
IL6	TCTTG C GATGCTAAA	TCTTG C ATGCTAAA
IL8	CATACA A TTGATAATTCA	CATAC A TTTGATAATTCA
CD40	GTCCTGCCGCTGGTCTCACCTCG C ATGGT TCGTCTGCCTCTGCAGTGCG	GTCCTGCCGCTGGTCTCACCTCG T ATGGTTC GTCTGCCTCTGCAGTGCG

4. RECURSOS MATERIALES EMPLEADOS

- Optotipos Snellen
- Lámparas de hendidura Haag Streit
- Lentes de exploración indirectas Nikon 90 D
- Retinografía con Retinógrafo GXD 50x Topcon
- Tomografía de coherencia óptica con Stratus OCT de Zeiss
- Angiografía fluoresceínica con Retinógrafo GXD 50x Topcon
- Tampón Fornace
- Formol y Cloroformo
- EDTA (ácido etildiamínico tetraacético)
- Proteinasa K
- Fenol CIAA
- Etanol al 70 % y 100%
- Tampón TE
- Espectrofotómetro (GeneQuant, Pharmacia)
- Tubos Eppendorf
- PCR SuperMix(Gibco-BRL) y MasterMix(Promega)
- Endonucleasa de restricción seleccionada
- Gel de agarosa con syber-safe
- Tampón de carga con colorantes: xileno-cianol y azul de bromofenol
- Fotografía digital bajo luz ultravioleta con programa Kodak Science ID
- Termociclador Applied Biosystems Step One
- Sondas Taqman

- Placas de 96 celdas
- Oligonucleótido cebador
- Agua destilada

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se usó el software SPSS (v 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL) para el estudio estadístico.

El estudio de la clasificación en grupos de casos y controles basado en los cambios de grosor retiniano central de los pacientes de la muestra a lo largo del estudio se llevó a cabo mediante un análisis de conglomerados o clusters, usando el método de silhouette para definir el número óptimo de conglomerados.

En el estudio genético, la comparación de la frecuencia de alelos y genotipos para cada SNP entre el grupo de casos y controles, así como el equilibrio de Hardy Weinberg, se realizó mediante test de Chi cuadrado. Se consideró significativo un p valor inferior a 0.05. Las medidas de asociación empleadas fueron la Odds Ratio (OR) y un Intervalo de Confianza (IC) de 95%.

Todo el estudio estadístico fue realizado por la Profesora Irene Mariñas del Collado, del Departamento de Estadística de la Universidad de Salamanca y por Carlos Gutiérrez Cerrajero, Investigador de apoyo asociado del Departamento de Medicina Molecular y del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL).

6. ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES

El estudio fue presentado y aceptado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

Todas las muestras se obtuvieron, previa firma del consentimiento informado correspondiente (Anexo 1), siguiendo las normas legales para Estudios Clínicos en España y las del Comité Ético de Investigación Clínica del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

Se tuvieron presentes en todo momento los principios expuestos en la Declaración de Helsinki (Asociación Médica Mundial, 59ª Asamblea General, Corea, 2008) para la investigación médica en seres humanos.

RESULTADOS

1. ANÁLISIS DE LOS DATOS CLÍNICOS Y DEMOGRÁFICOS

Tabla 6. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES DE LA MUESTRA	
MEDIA DE EDAD (AÑOS)	32.62 (20 – 49)
DISTRIBUCIÓN POR SEXO (%)	
Varón	50.63
Mujer	49.36
MEDIA DE TIEMPO EVOLUCIÓN DM (AÑOS)	22.05 (10 - 29)
MEDIA HBA1C (%)	
Al inicio del estudio	7.85
Al final del estudio	7.63
PREVALENCIA USO BOMBA DE INSULINA AL FINAL DEL ESTUDIO (%)	39.24
PREVALENCIA DE MICROALBUMINURIA (%)	15.18
PREVALENCIA DE HTA (%)	8.86
PREVALENCIA DE DISLIPEMIA (%)	36.70
PREVALENCIA DE IMC >25 (%)	27.84
PREVALENCIA DE EMD (%)	
Al inicio del estudio	2.53
Al final del estudio	3.79
GRADO DE RD (%)	
Al inicio del estudio	
Sin RD	64.55
RD leve	27.84
RD moderada	7.59
Al final del estudio	
Sin RD	48.10
RD leve	36.70
RD moderada	15.18

2. ANÁLISIS DE DATOS TOMOGRÁFICOS

Se tomaron los valores de grosor retiniano de cada sector macular de cada ojo de cada paciente de la muestra obtenidos con OCT al inicio y al final del estudio (Anexo 3).

A partir de estos datos se estudiaron estadísticamente las diferencias en las variaciones de grosor retiniano de los distintos pacientes a lo largo del estudio para poder definir grupos caracterizados por similares patrones de engrosamiento retiniano.

Para ello, se utilizó un **Análisis de cluster o de conglomerados**. Este análisis es una técnica estadística multivariante de clasificación automática de datos que busca agrupar variables tratando de lograr la máxima homogeneidad en cada grupo y la mayor diferencia entre los grupos, de manera que individuos que puedan ser considerados similares sean asignados a un mismo cluster, mientras que individuos diferentes se localicen en clusters distintos. Para realizar este estudio se siguieron los siguientes pasos:

- Elección de las variables: los valores tomográficos de la muestra en cada uno de los diez sectores estudiados en cada paciente (central, nasal, superior, temporal e inferior de cada uno de los ojos).
- Elección de una medida de asociación: la diferencia o distancia entre los valores tomográficos de los individuos de la muestra.
- Estandarización de los datos tomográficos de la muestra: transformación de los datos en una distribución normal estandarizada con media igual a 0 y desviación estándar igual a 1.
- Elección de la técnica cluster: se utilizó un método no jerárquico de reasignación de k-medias. Esta técnica está diseñada para dividir a los individuos de una muestra en

grupos, o k , buscando intercambiar los miembros de los clusters entre sí con el objetivo de determinar la clasificación más homogénea intragrupo y más heterogénea intergrupos. La representación gráfica de los resultados del análisis de las diez variables analizadas en este estudio, correspondientes a los distintos sectores tomográficos, en diagramas bi o tridimensionales convencionales entraña una gran dificultad por la gran cantidad de datos a mostrar. Para resolver este problema, se realizó un Análisis de componentes principales. Esta técnica se utiliza para describir un conjunto de datos en términos de nuevas variables o “componentes” no correlacionadas que se ordenan por la cantidad de varianza original que describen con la finalidad de reducir la dimensionalidad de la muestra. Tras aplicar este método, se describen dos nuevos componentes llamados dimensión 1 (Dim1) y dimensión 2 (Dim 2) con el objetivo de hacer posible la representación de la mayor parte de los datos analizados. De esta manera, se consiguió representar en un gráfico un 76% de la variabilidad de los datos tomográficos de la muestra. En la Figura 19 se representa la distribución de los pacientes en dos, tres, cuatro y cinco clústeres, y las distancias de los clusters entre sí, mostrando las similitudes y discrepancias entre las medidas tomográficas de cada paciente expresadas mediante las distancias entre ellos en un diagrama de clusters de dos dimensiones. En cada diagrama, las medidas tomográficas de cada paciente están representadas con un punto, cuadrado, triángulo, +, o x, y en distintos colores en función del cluster al que pertenecen (la asignación del símbolo o el color se asigna aleatoriamente en cada uno de los 4 análisis mostrados, no guardando relación entre sí).

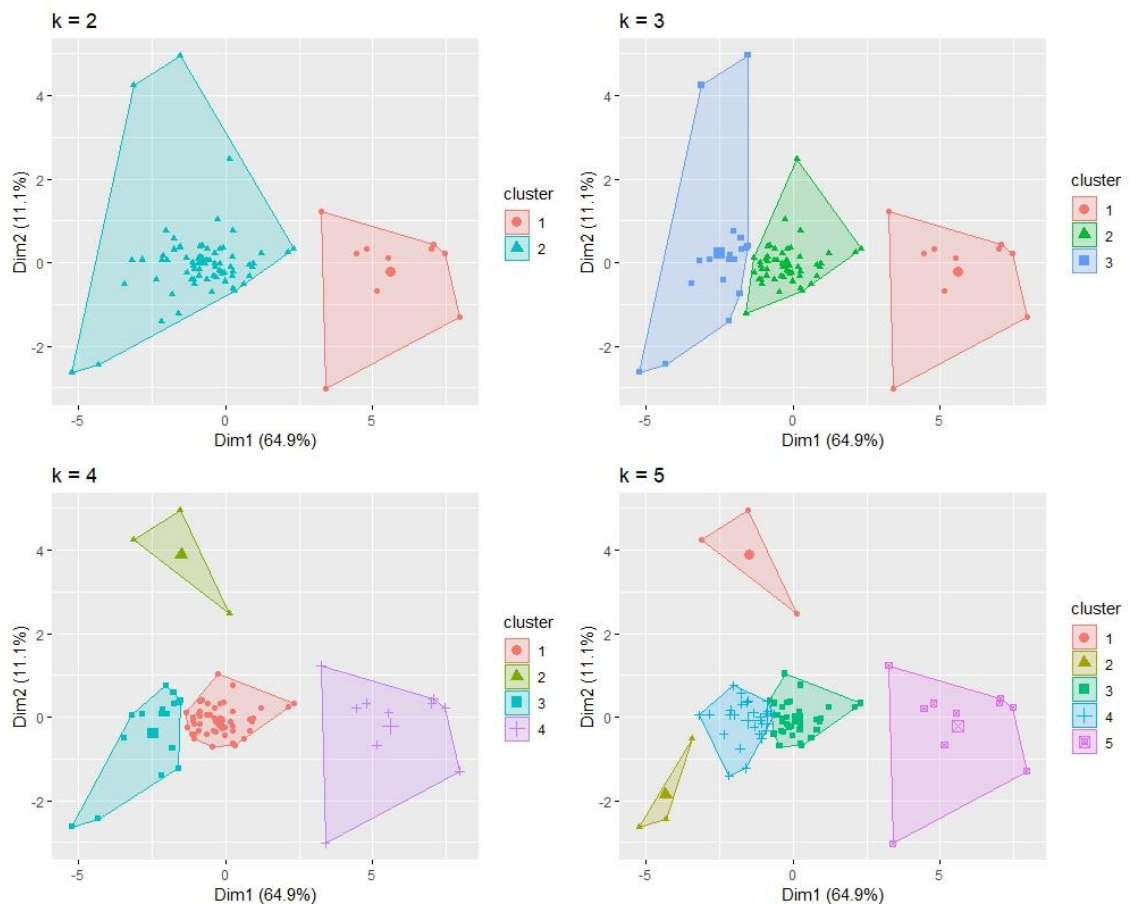


Figura 17: Diagramas de análisis de 2, 3, 4 y 5 clusters ($k=1$, $k=2$, $k=3$, $k=4$, $k=5$) con representación de los resultados en dos dimensiones (Dim) que engloban el 76 % de la variabilidad de los datos de la muestra estandarizados (Dim 1: 64.9%, Dim 2: 11.1%). Análisis de clasificación en 2 clusters ($k=2$, arriba izquierda), 3 clusters ($k=3$, arriba derecha), 4 clusters ($k=4$, abajo izquierda) o 5 clusters ($k=5$, abajo derecha).

- Elección del número óptimo de clusters: el Análisis silhouette es un método de interpretación y validación de la coherencia dentro de los clusters y aporta información acerca de cuál es la clasificación más apropiada para ese conjunto de datos. Un diagrama de análisis silhouette muestra una medida de la similitud de un punto con respecto al resto de puntos de su mismo cluster, en comparación con la similitud con respecto a los puntos de otros grupos. Esta medida (*average silhouette width*) tiene un rango de $(-1 - 1)$, siendo la clasificación que más se aproxima a uno

la más adecuada. En la figura 20 se representa el Análisis silhouette de los resultados del análisis de k medias realizado, y se determina que la clasificación de los datos tomográficos de los pacientes en dos clusters es la más adecuada para representar la variabilidad entre ellos.

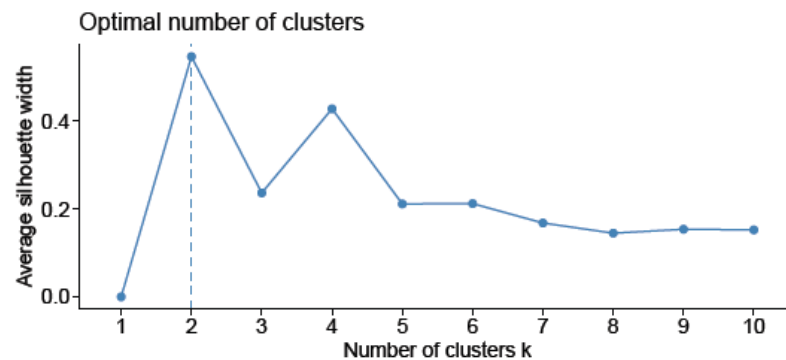


Figura 18. Diagrama que muestra los resultados de la aplicación del método de validación de consistencia de k medias *Shilouette*: determina que 2 es el número óptimo de clusters para clasificar la variabilidad de los datos tomográficos de la muestra. (*optimal number of clusters*; número óptimo de clusters; *average shilouette width*: anchura media shilouette; *number of clusters k*: número de clusters)

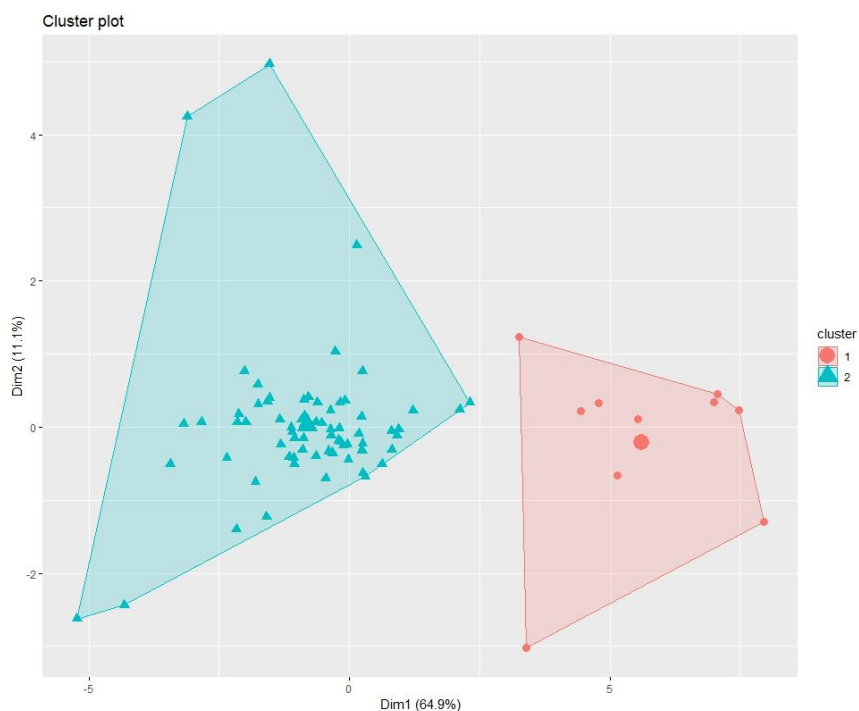


Figura 19: Diagrama de los dos clusters definitivos.

- Descripción de los clusters definitivos:

Tabla 7: Datos descriptivos de los clusters 1 y 2.

DATOS DESCRIPTIVOS	CLUSTER 1	CLUSTER 2
SEXO (%)		
- VARÓN	46.37	80
- MUJER	53.62	20
MEDIA DE EDAD (años)		
	34.27	35.2
MEDIA DE HBA1c (%)		
- INICIO DEL ESTUDIO	7.86	7.80
- FINAL DEL ESTUDIO	7.64	7.55
BOMBA DE INSULINA (%)		
- SI	40.57	40
- NO	59.42	60
GRADO RD AL FINAL DEL ESTUDIO (%)		
- NO USAN BOMBA DE INSULINA:		
Sin RD	48.78	14.27
RD leve	29.26	71.42
RD moderada	21.95	14.27
- USAN BOMBA DE INSULINA:		
Sin RD	53.57	66.66
RD leve	39.28	33.33
RD moderada	7.14	0

- **Datos tomográficos de los clusters 1 y 2 definitivos:**

Tabla 8: Medias del porcentaje de cambio de grosor retiniano experimentado a lo largo del estudio por sectores y totales al final del estudio de los pacientes de los clusters 1 y 2.

DATOS TOMOGRÁFICOS (% de cambio de grosor a lo largo del estudio)	CLUSTER 1	CLUSTER 2
OJO DERECHO		
- CENTRAL	9.49	23.13
- SECTOR SUPERIOR	2.85	17.83
- SECTOR NASAL	4.11	14.30
- SECTOR INFERIOR	4.27	15.54
- SECTOR TEMPORAL	3.25	19.68
- MEDIA TOTAL OD	4.79	18.09
OJO IZQUIERDO		
- CENTRAL	8.26	30.70
- SECTOR SUPERIOR	3.19	17.77
- SECTOR NASAL	4.05	16.91
- SECTOR INFERIOR	4.15	19.03
- SECTOR TEMPORAL	4.82	22.43
- MEDIA TOAL OI	4.89	21.36
MEDIA TOTAL DE VARIACIÓN DE GRC DE AMBOS OJOS *	4.84	19.73

(*) GRC: Grosor Retiniano Central: media del grosor de todos los sectores tomográficos de los dos ojos de cada paciente.

Tras analizar estos resultados, se comprobó que todos los pacientes del cluster 2 habían experimentado aumentos porcentuales de grosor retiniano en todos los sectores de ambos ojos significativamente mayores que los experimentados por los pacientes del cluster 1. La media total de variación porcentual de grosor de ambos ojos en el cluster 2 era de 19.73 % frente al 4.84 % en el cluster 1.

Basándonos en estos resultados, y tomando como referencia el estudio de Krzystolik et al (135), (en el que se plantea la variación porcentual de al menos 11% para considerar significativos los valores de las mediciones tomográficas y poder descartar que no puedan ser debidas a errores de medición, como los errores de protocolo de adquisición de la imagen o de calibración del equipo de OCT), redefinimos los dos clusters ya descritos de la siguiente manera:

- **Grupo de Controles (cluster 1):** aquellos pacientes que habían experimentado un aumento porcentual de GRC inferior al 11% al final del estudio (media = 4.84 %) (siendo GRC el Grosor Retiniano Central, o grosor retiniano medio de todos los sectores y de los dos ojos de cada paciente de la muestra)
- **Grupo de Casos (cluster 2):** Aquellos pacientes que habían experimentado un aumento porcentual de GRC superior al 11% al final del estudio (media = 19.73 %) (siendo GRC el Grosor Retiniano Central, o grosor retiniano medio de todos los sectores y de los dos ojos de cada paciente de la muestra).

3. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE EL GROSOR RETINIANO CENTRAL Y EL SEXO

Se tomaron las cifras de GRC de los pacientes de la muestra, varones y mujeres, al inicio del estudio. La media fue de 204.825 (desviación estándar 23.361) y 189.743 (desviación estándar 22.921) respectivamente. Se realizó un análisis de varianzas, en el que la probabilidad asociada al estadístico de Levene fue igual a 0.870, por lo que asumimos varianzas iguales. Tras realizar análisis Test t Student para varianzas iguales se obtuvo un resultado de $p < 0.005$, por lo que asumimos que existen diferencias estadísticamente significativas en los valores de grosor macular entre varones y mujeres al inicio del estudio.

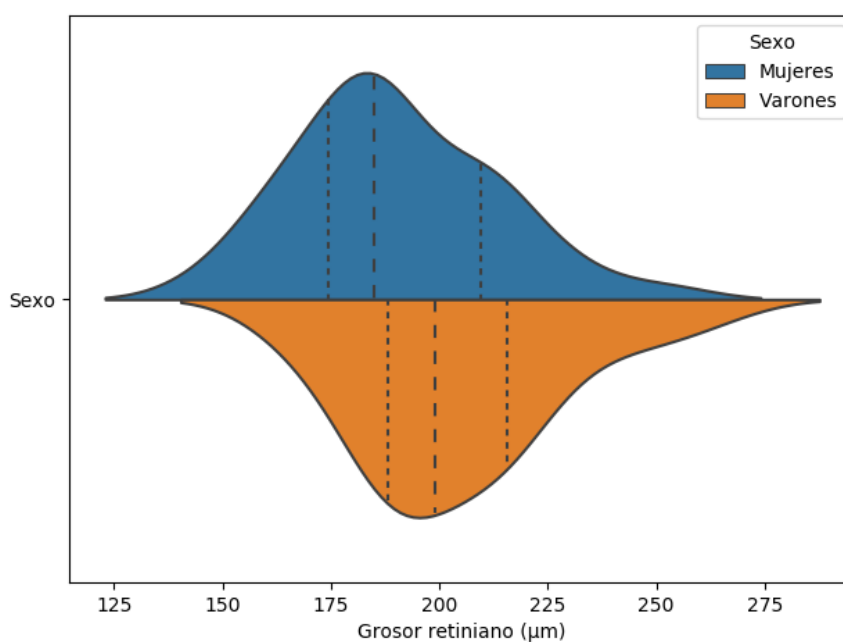


Figura 20. Diagrama *Violin plot* de la distribución y la densidad de los valores de grosor retiniano central expresados en micras de los pacientes de la muestra al inicio del estudio en función del sexo (mujeres en azul, hombres en naranja); con representación de cuartiles Q1, y Q3 (líneas discontinuas de puntos) y Q2 (líneas discontinuas de rayas). Media en varones = 204.825 (desviación estándar 23.361). Media en mujeres = 189.743 (desviación estándar 22.921).

4. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE EL GROSOR RETINIANO CENTRAL Y LA HEMOGLOBINA GLICOSILADA

Para llevar a cabo este análisis, realizamos una comparación de las cifras de Hemoglobina glicosilada al final del estudio entre el grupo de pacientes que habían experimentado un aumento del grosor macular central superior al 5% frente a las de aquellos con un aumento inferior al 5% al final del estudio, no encontrando diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ($p > 0.005$).

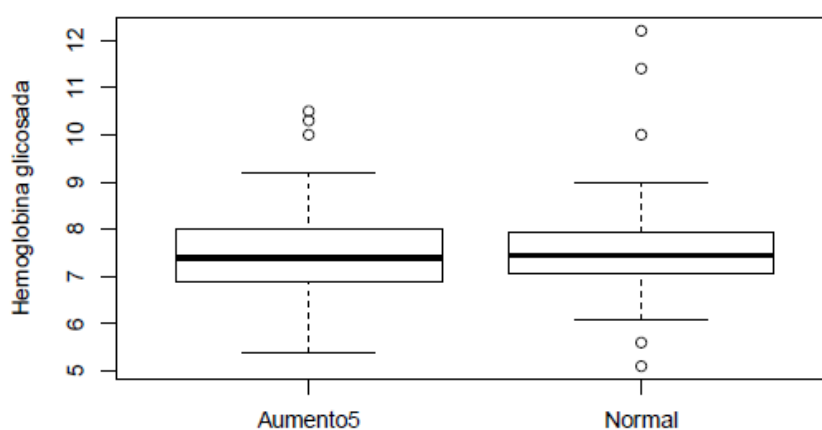


Figura 21: Diagrama de cajas en el que se representan los cuartiles Q1, Q2 (mediana) y Q3 así como los valores máximos y mínimos no atípicos, y los valores atípicos de Hemoglobina glicosilada de la muestra de los 2 grupos: aquellos con aumento de GRC >5 % (Aumento5), y aquellos con aumento de GRC <5% (normal).

5. ANÁLISIS GENÉTICO DE LA SUSCEPTIBILIDAD AL ENGROSAMIENTO RETINIANO

5.1 ANÁLISIS DE LA RELACIÓN DE SNP rs1799983 DEL GEN NOS3 CON EL AUMENTO DE GROSOR RETINIANO

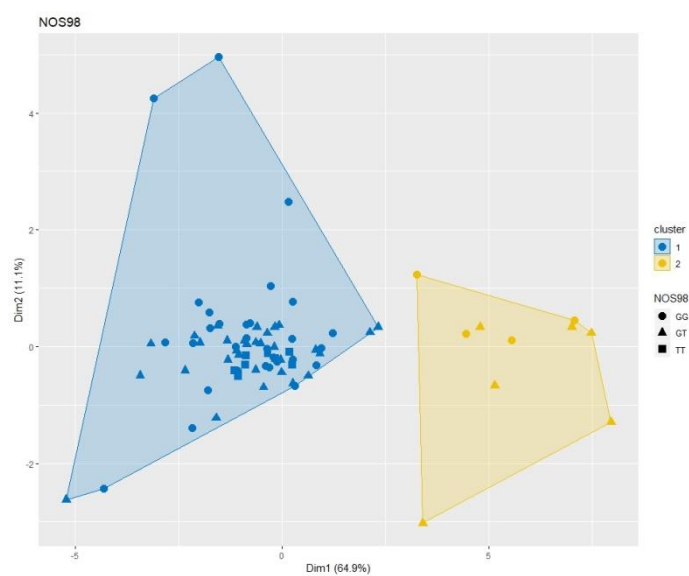


Figura 22: Diagrama de clusters con la distribución de genotipos de SNP rs1799983 del gen NOS3 en los grupos de casos (cluster 2, en color amarillo) y controles (cluster 1, en color azul). El genotipo GG está representado con un círculo, GT con un triángulo y TT con un cuadrado.

Tabla 9 Distribución de alelos, genotipos y agrupación de genotipos de los individuos de la muestra en los grupos de casos y controles para el SNP rs1799983 del gen NOS3.

SNP NOS3 rs1799983	Controles (n=69)	Casos (n=10)	p-valor	OR (IC 95%)
ALELO				
G	91 (0.65)	14 (0.70)	0.91	0.83 (0.29-2.29)
T	47 (0.34)	6 (0.30)		
GENOTIPO				
G/G	30 (0.43)	4 (0.40)	0.44	
G/T	31 (0.44)	6 (0.60)		
T/T	8 (0.11)	0 (0.00)		
DOMINANCIA				
G/G + G/T	61 (0.88)	10 (1.00)	0.56	0.38 (0.02-7.17)
T/T	8 (0.11)	0 (0.00)		
G/G	30 (0.43)	4 (0.40)	0.89	1.15 (0.29-4.45)
G/T + T/T	39 (0.56)	6 (0.60)		

En el análisis de la distribución de frecuencias alélicas, de genotipos y de agrupación de genotipos en los grupos de casos y controles para este polimorfismo, no encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p > 0.05$).

5.2 ANÁLISIS DE LA RELACIÓN DE SNP rs5370 DEL GEN ET1 CON EL AUMENTO DE GROSOR RETINIANO

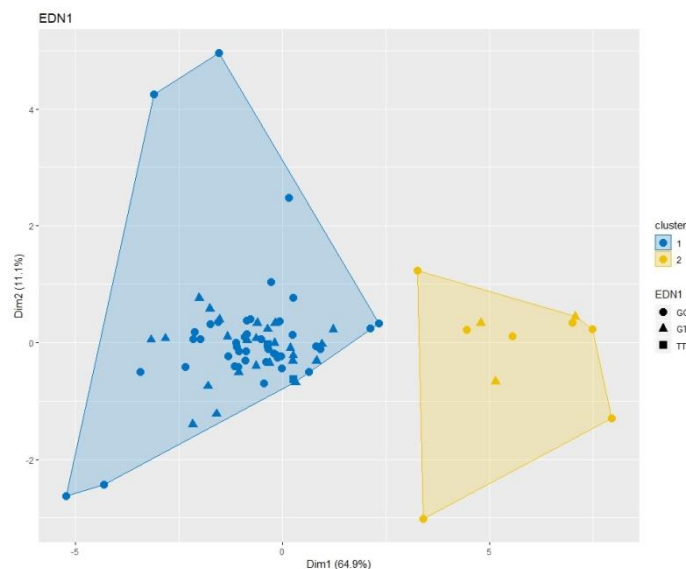


Figura 23: Diagrama de clusters con la distribución de genotipos de SNP rs5370 del gen ET1 en los grupos de casos (cluster 2, en color amarillo) y controles (cluster 1, en color azul). El genotipo GG está representado con un círculo, GT con un triángulo y TT con un cuadrado.

Tabla 10. Distribución de alelos, genotipos y agrupación de genotipos de los individuos de la muestra en los grupos de casos y controles para el SNP rs5370 del gen ET-1.

SNP ET1 rs5370	Controles (n=69)	Casos (n=10)	p-valor	OR (IC 95%)
ALELO				
G	109 (0.78)	17 (0.85)	0.74	0.66 (0.18-2.41)
T	29 (0.21)	3 (0.15)		
GENOTIPO				
G/G	42 (0.60)	7 (0.70)	0.77	
G/T	25 (0.36)	3 (0.30)		
T/T	2 (0.02)	0 (0.00)		
DOMINANCIA				
G/G + G/T	67 (0.97)	10 (1.00)	0.59	1.67 (0.07-39.8)
T/T	2 (0.02)	0 (0.00)		
G/G	42 (0.60)	7 (0.70)	0.83	0.66 (0.15-2.80)
G/T + T/T	27 (0.39)	3 (0.30)		

En el análisis de la distribución de frecuencias alélicas, de genotipos y de agrupación de genotipos en los grupos de casos y controles para este polimorfismo, no encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p > 0.05$).

5.3 ANÁLISIS DE LA RELACIÓN DE SNP rs699947 DEL GEN VEGF CON EL AUMENTO DE GROSOR RETINIANO

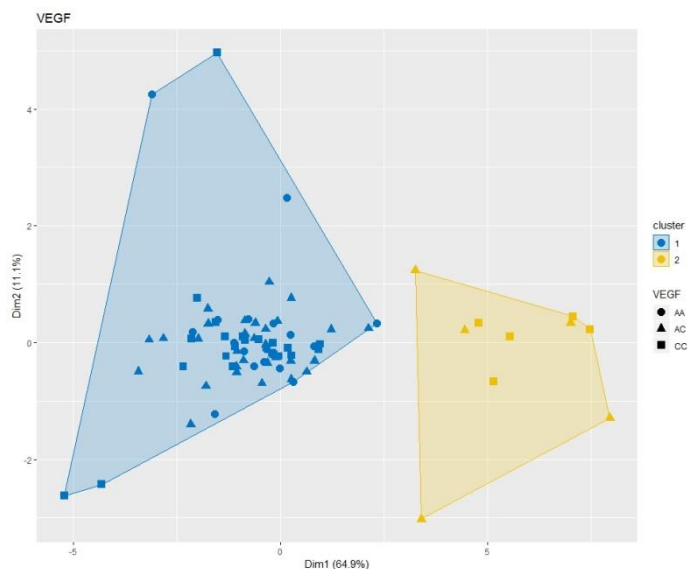


Figura 24: Diagrama de clusters con la distribución de genotipos de SNP rs699947 del gen VEGF en los grupos de casos (cluster 2, en color amarillo) y controles (cluster 1, en color azul). El genotipo AA está representado con un círculo, AC con un triángulo y CC con un cuadrado.

Tabla 11. Distribución de alelos, genotipos y agrupación de genotipos de los individuos de la muestra en los grupos de casos y controles para el SNP rs699947 del gen VEGF.

SNP VEGF Rs699947	Controles (n=69)	Casos (n=10)	p-valor	OR (IC 95%)
ALELO				
A	64 (0.46)	5 (0.25)	0.11	2.59 (0.89-7.53)
C	74 (0.53)	15 (0.75)		
GENOTIPO				
A/A	17 (0.24)	0 (0.00)	0.18	
A/C	30 (0.43)	5 (0.50)		
C/C	22 (0.31)	5 (0.50)		
DOMINANCIA				
A/A + A/C	47 (0.68)	5 (0.50)	0.44	2.13 (0.56-8.15)
C/C	22 (0.31)	5 (0.50)		
A/A	17 (0.24)	0 (0.00)	0.17	6.53 (0.36-11.7)
A/C + C/C	52 (0.75)	10 (1.00)		

En el análisis de la distribución de frecuencias alélicas, de genotipos y de agrupación de genotipos en los grupos de casos y controles para este polimorfismo, no encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p > 0.05$).

5.4 ANÁLISIS DE LA RELACIÓN DE SNP rs16944 DEL GEN IL1B CON EL AUMENTO DE GROSOR RETINIANO

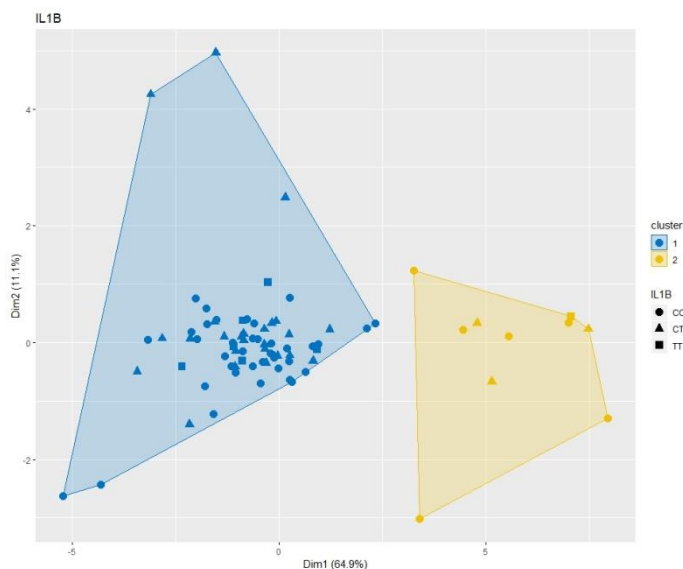


Figura 25: Diagrama de clusters con la distribución de genotipos de SNP rs16944 de IL1B en los grupos de casos (cluster 2, en color amarillo) y controles (cluster 1, en color azul). El genotipo CC está representado con un círculo, CT con un triángulo y TT con un cuadrado.

Tabla 12. Distribución de alelos, genotipos y agrupación de genotipos de los individuos de la muestra en los grupos de casos y controles para el SNP rs16944 de ILB1.

SNP ILB1 Rs16944	Controles (n=69)	Casos (n=10)	p-valor	OR (IC 95%)
ALELO				
C	101 (0.73)	15 (0.75)	0.92	0.91 (0.30-2.67)
T	37 (0.26)	5 (0.25)		
GENOTIPO				
C/C	38 (0.55)	6 (0.60)	0.92	
C/T	25 (0.36)	3 (0.30)		
T/T	6 (0.08)	1 (0.10)		
DOMINANCIA				
C/C + C/T	63 (0.91)	9 (0.90)	0.64	1.16 (0.12-10.8)
T/T	6 (0.08)	1 (0.10)		
C/C	38 (0.55)	6 (0.60)	0.96	0.81 (0.21-3.15)
C/T + T/T	31 (0.44)	4 (0.40)		

En el análisis de la distribución de frecuencias alélicas, de genotipos y de agrupación de genotipos en los grupos de casos y controles para este polimorfismo, no encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p > 0.05$).

5.5 ANÁLISIS DE LA RELACIÓN DE rs2070874 DEL GEN IL 4 CON EL AUMENTO DE GROSOR RETINIANO

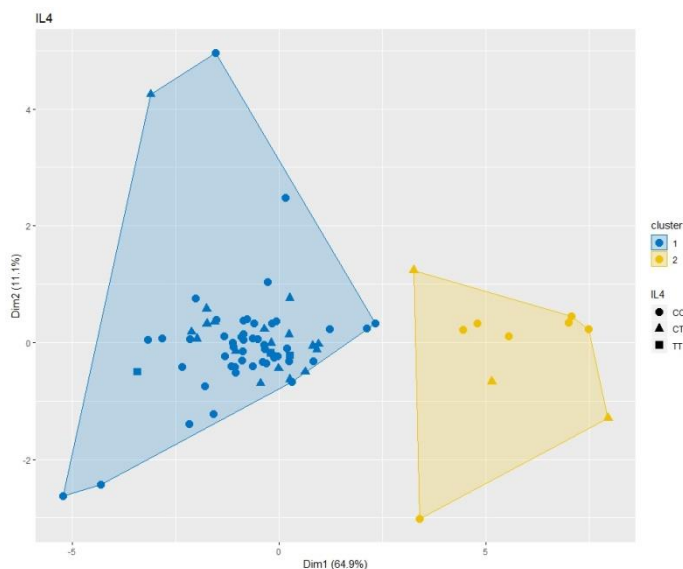


Figura 26: Diagrama de clusters con la distribución de genotipos de SNP rs2070874 del gen IL4 en los grupos de casos (cluster 2, en color amarillo) y controles (cluster 1, en color azul). El genotipo CC está representado con un círculo, CT con un triángulo y TT con un cuadrado.

Tabla 13. Distribución de alelos, genotipos y agrupación de genotipos de los individuos de la muestra en los grupos de casos y controles para el SNP rs2070874 del gen IL4.

SNP IL4 Rs2070874	Controles (n=69)	Casos (n=10)	p-valor	OR (IC 95%)
ALELO				
C	114 (0.82)	17 (0.85)	0.95	0.83 (0.22-3.08)
T	24 (0.17)	3 (0.15)		
GENOTIPO				
C/C	48 (0.69)	7 (0.70)	0.78	
C/T	18 (0.26)	3 (0.30)		
T/T	3 (0.04)	0 (0.00)		
DOMINANCIA				
C/C + C/T	66 (0.95)	10 (1.00)	0.83	1.10 (0.05-2.36)
T/T	3 (0.04)	0 (0.00)		
C/C	48 (0.69)	7 (0.70)	0.73	0.98 (0.23-4.16)
C/T + T/T	21 (0.30)	3 (0.30)		

En el análisis de la distribución de frecuencias alélicas, de genotipos y de agrupación de genotipos en los grupos de casos y controles para este polimorfismo, no encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p > 0.05$).

5.6 ANÁLISIS DE LA RELACIÓN DE SNP rs1800795 DEL GEN IL-6 CON EL AUMENTO DE GROSOR RETINIANO

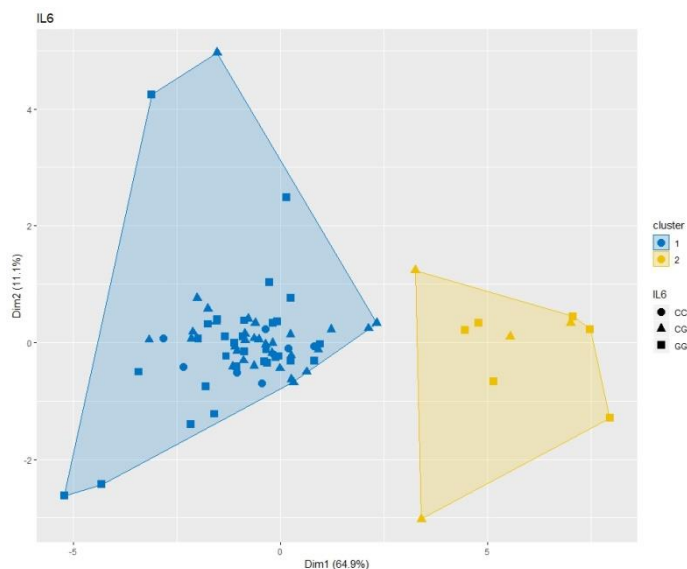


Figura 27: Diagrama de clusters con la distribución de genotipos de SNP rs1800795 del gen IL6 en los grupos de casos (cluster 2, en color amarillo) y controles (cluster 1, en color azul). El genotipo CC está representado con un círculo, CG con un triángulo y GG con un cuadrado.

Tabla 14. Distribución de alelos, genotipos y agrupación de genotipos de los individuos de la muestra en los grupos de casos y controles para el SNP rs1800795 del gen IL-6.

SNP IL6 Rs1800795	Controles (n=69)	Casos (n=10)	p-valor	OR (IC 95%)
ALELO				
C	47 (0.34)	4 (0.20)	0.31	2.06 (0.65-6.53)
G	91 (0.65)	16 (0.80)		
GENOTIPO				
C/C	8 (0.11)	0 (0.00)	0.42	
C/G	31 (0.44)	4 (0.40)		
G/G	30 (0.43)	6 (0.60)		
DOMINANCIA				
C/C + C/G	39 (0.56)	4 (0.40)	0.52	1.95 (0.50-7.53)
G/G	30 (0.43)	6 (0.60)		
C/C	8 (0.11)	0 (0.00)	0.56	2.62 (0.13-4.93)
C/G + G/G	61 (0.88)	10 (1.00)		

En el análisis de la distribución de frecuencias alélicas, de genotipos y de agrupación de genotipos en los grupos de casos y controles para este polimorfismo, no encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p > 0.05$).

5.7 ANÁLISIS DE LA RELACIÓN DE SNP rs4073 DEL GEN IL-8 CON EL AUMENTO DE GROSOR RETINIANO

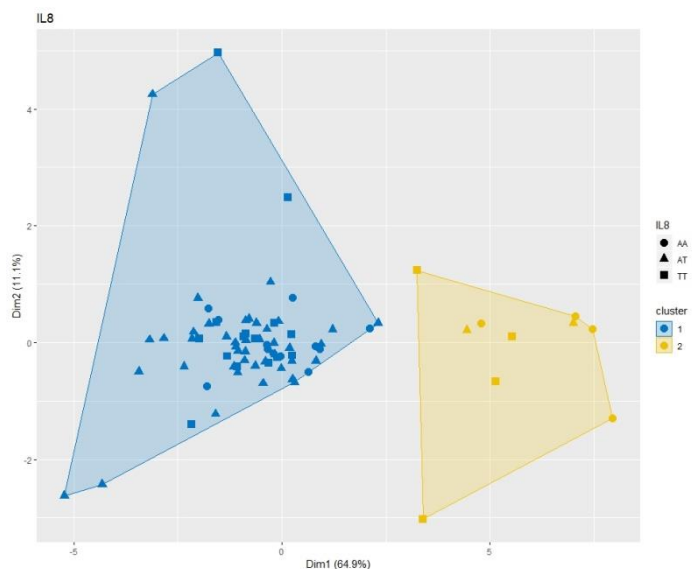


Figura 28: Diagrama de clusters con la distribución de genotipos de SNP rs4073 del gen IL8 en los grupos de casos (cluster 2, en color amarillo) y controles (cluster 1, en color azul). El genotipo AA está representado con un círculo, AT con un triángulo y TT con un cuadrado.

Tabla 15. Distribución de alelos, genotipos y agrupación de genotipos de los individuos de la muestra en los grupos de casos y controles para el SNP rs4073 del gen IL8.

SNP IL8 rs4073	Controles (n=69)	Casos (n=10)	p-valor	OR (IC 95%)
ALELO				
A	66 (0.47)	10 (0.50)	0.95	0.91 (0.35-2.34)
T	72 (0.52)	10 (0.50)		
GENOTIPO				
A/A	12 (0.17)	4 (0.40)	0.04	
A/T	42 (0.60)	2 (0.20)		
T/T	15 (0.21)	4 (0.40)		
DOMINANCIA				
A/A + A/T	54 (0.78)	6 (0.60)	0.38	2.40 (0.59-9.62)
T/T	15 (0.21)	4 (0.40)		
A/A	12 (0.17)	4 (0.40)	0.21	0.31 (0.07-1.29)
A/T + T/T	57 (0.82)	6 (0.60)		

En el análisis de la distribución de genotipos entre el grupo de casos y de controles para este polimorfismo, encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p < 0.05$). Las mayores desviaciones se dan en los niveles del genotipo AT, que se presenta con mayor frecuencia en el grupo de controles con diferencia estadísticamente significativa con respecto a los otros genotipos. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los dos grupos en el análisis de las distribuciones alélicas o en el de agrupación de genotipos.

Tabla 16. Comparación de genotipos para SNP rs4073 del gen IL8.

SNP IL8 rs4073	p-valor	OR (IC 95%)
GENOTIPO		
A/A vs A/T	0.036	0.143 (0.023-0.877)
A/T vs T/T	0.060	5.600 (0.929-33.77)
A/A vs T/T	0.800	0.782 (0.165-3.882)

Para descartar que este resultado pudiese estar influenciado por las diferencias de grosor retiniano entre hombres y mujeres presente en la muestra al inicio del estudio, se realizó un subanálisis del polimorfismo de IL8 en función del sexo, no encontrando diferencias estadísticamente significativas que pudiesen justificar los resultados previamente obtenidos.

Tabla 17. Distribución de alelos, genotipos y agrupación de genotipos de los individuos de la muestra en los grupos de mujeres y varones para el SNP rs4073 del gen IL8.

SNP IL8	Mujeres (n=39)	Varones (n=40)	p-valor	OR (IC 95%)
ALELO				
A	38 (0.48)	38 (0.47)	0.99	1.05 (0.56-1.96)
T	40 (0.51)	42 (0.52)		
GENOTIPO				
A/A	8 (0.20)	8 (0.20)	0.98	
A/T	22 (0.56)	22 (0.55)		
T/T	9 (0.23)	10 (0.25)		
DOMINANCIA				
A/A + A/T	30 (0.76)	30 (0.75)	0.94	1.11 (0.39-3.12)
T/T	9 (0.23)	10 (0.25)		
A/A	8 (0.20)	8 (0.20)	0.82	1.03 (0.34-3.09)
A/T + T/T	31 (0.79)	32 (0.80)		

5.8 ANÁLISIS DE LA RELACIÓN DE SNP rs1883832 DEL GEN CD40 CON EL AUMENTO DE GROSOR RETINIANO

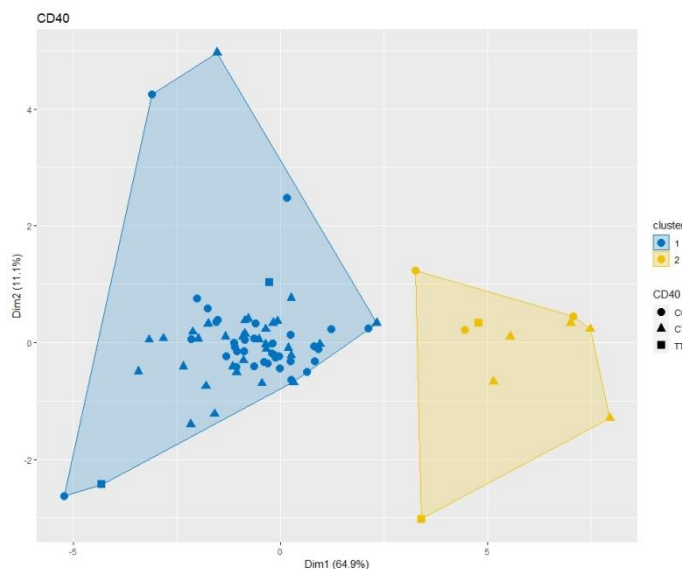


Figura 29: Diagrama de clusters con la distribución de genotipos de SNP rs1883832 del gen CD40 en los grupos de casos (cluster 2, en color amarillo) y controles (cluster 1, en color azul). El genotipo CC está representado con un círculo, CT con un triángulo y TT con un cuadrado.

Tabla 18. Distribución de alelos, genotipos y agrupación de genotipos de los individuos de la muestra en los grupos de casos y controles para el SNP rs1883832 de CD40.

SNP CD40 rs1883832	Controles (n=69)	Casos (n=10)	p-valor	OR (IC 95%)
ALELO				
C	102 (0.73)	11 (0.55)	0.13	2.31 (0.88-6.05)
T	36 (0.26)	9 (0.45)		
GENOTIPO				
C/C	35 (0.50)	3 (0.30)	0.056	
C/T	32 (0.46)	5 (0.50)		
T/T	2 (0.02)	2 (0.20)		
DOMINANCIA				
C/C + C/T	67 (0.97)	8 (0.80)	0.12	8.37 (1.03-67.8)
T/T	2 (0.02)	2 (0.20)		
C/C	35 (0.50)	3 (0.30)	0.37	2.40 (0.57-10.0)
C/T + T/T	34 (0.49)	7 (0.70)		

En el análisis de la distribución de frecuencias alélicas, de genotipos y de agrupación de genotipos en los grupos de casos y controles para este polimorfismo, no encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p > 0.05$).

DISCUSIÓN

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica de gran importancia sociosanitaria. Se estima que en los próximos años afectará a un número mucho mayor de personas en países desarrollados debido fundamentalmente al estilo de vida sedentario y a los hábitos alimentarios de una población cada vez más envejecida. Con este aumento previsto en la incidencia de la DM, se prevé asimismo un aumento paralelo de las complicaciones multiorgánicas asociadas a la hiperglucemia crónica, y la retinopatía diabética es de todas ellas, quizás la más temida, por representar una seria amenaza para la visión de estos pacientes. El edema macular diabético representa la causa más frecuente de pérdida de visión reversible en pacientes diabéticos, y la mayoría de los esfuerzos de la comunidad científica oftalmológica actualmente se orientan hacia el diseño de estrategias de abordaje diagnóstico y terapéutico precoz destinadas a prevenir tan temida complicación. La etiopatogenia del EMD es multifactorial, siendo los factores de alteración vascular secundarios a la hiperglucemia crónica los más importantes y reconocidos, y frente a los que se han diseñado terapias farmacológicas que, a pesar de ser eficaces, suponen un elevado gasto sanitario así como una exagerada presión asistencial. Otros factores que históricamente han sido más olvidados, como son los genéticos, representan cada vez más un reto, así como un terreno de investigación muy interesante, ya que podrían justificar tanto las diferencias interindividuales en la instauración, mantenimiento y evolución natural o respuesta a los tratamientos convencionales, como la predisposición de determinada población de pacientes diabéticos a desarrollar EMD. Conocer de antemano qué pacientes pueden tener una mayor predisposición a desarrollar la complicación en función de su perfil genético puede ser de gran ayuda a la hora de establecer las bases de las estrategias de detección precoz mediante cribado, sobre todo en lo que concierne a fijar el momento idóneo para realizar la primera evaluación oftalmológica así como la periodicidad de las siguientes, evitando de esta manera sobrecargar a un ya de por sí saturado servicio de salud. Por otro lado, igualmente tendría una especial relevancia conocer este perfil de predisposición genética a desarrollar engrosamiento

macular de cara a establecer una pauta proactiva optimizada de tratamiento que sea capaz de anticiparse a la instauración del EMD y suficiente para controlar la enfermedad, evitando la cronicidad y las frecuentes recidivas.

En una patología multifactorial como la DM, establecer una población diana para un estudio de estas características supone una gran dificultad, ya que es difícil controlar el efecto que puedan tener otras patologías concomitantes en los resultados de la muestra. Por este motivo, en el diseño de este estudio se decidió seleccionar exclusivamente pacientes con DM tipo 1, de **edad media** (media de edad al inicio del estudio de 32.62 años), con un **tiempo de evolución de la enfermedad** similar (media de tiempo de evolución de la DM al final del estudio de 22,05 años), y que presentasen el menor número posible de **comorbilidades** para evitar sesgo por afectación retiniana secundaria a cualquier otra alteración vascular no relacionada directamente con la diabetes. En la muestra, sólo 15.18 % presentaba microalbuminuria, 8,86 % hipertensión arterial, 36,70 % dislipemia, y 27,84 % un IMC > 25. En todos los casos, estas patologías eran de reciente diagnóstico, bajo grado de afectación, y se encontraban controladas exclusivamente con medicación o medidas preventivas higiénico dietéticas. Hasta la fecha ninguna de estas alteraciones se ha relacionado significativamente con cambios en el grosor retiniano en la literatura científica (136).

La **distribución por sexo** de la muestra se determinó de manera que fuese representativa e igualitaria (varones 50.63 % y mujeres 49.36 %) Estudiamos las posibles diferencias de GRC al inicio del estudio entre los varones y las mujeres de nuestra muestra. Las medias de GRC en hombres y mujeres fueron de 204.825 y 189.743 micras respectivamente. Tras el estudio estadístico, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el GRC entre varones y mujeres. Estas diferencias ya han sido descritas anteriormente (137, 138). Concretamente, en uno de estos estudios que analizaban el GRC con el mismo sistema de OCT

al usado en este estudio, Bressler et al (137) describieron una diferencia de grosor media de 209 ± 18 micras en hombres y 194 ± 23 micras en mujeres en una población de sujetos con DM1 o 2, sin EMD ni RD. Esta pequeña diferencia de grosor, que se considera de manera generalizada como fisiológica, no justifica las grandes diferencias de grosor macular entre casos y controles detectadas en nuestro estudio (un aumento de grosor medio global en el grupo de los casos de más del 19.73 % en comparación al 4.84 % del de los controles) (Tabla 8) a pesar de que la proporción varones/mujeres en el grupo de casos es de 80/20 %, mientras que la del de los controles es de 46.37/53.62 %. Tampoco encontramos ninguna relación del sexo con los resultados significativos del análisis genético de los distintos polimorfismos y su relación con las variaciones de GRC a lo largo del estudio.

En cuanto al **control metabólico**, las cifras medias de HbA1c al inicio y al final del estudio fueron similares (al inicio del estudio: 7.859 % (+/- 1.212), al final del estudio: 7.63 % (+/- 1.225) lo cual indica un buen control metabólico general en la muestra. Se considera que un mal control metabólico implica en la mayoría de los casos, una mayor gravedad de RD, así como un riesgo de aumento del grosor retiniano asociado a largo plazo. Goldstein et al (26) describen un retraso en el desarrollo de RD de al menos dos años en pacientes con HbA1c < 7.5 % en comparación con aquellos con cifras superiores. Se sugiere que un descenso del 1 % en las cifras de HbA1c puede suponer una reducción del 40 % en el riesgo de RD. Klein et al (21) en el estudio WESDR analizaron la incidencia acumulada durante 10 años de edema macular en una muestra de 891 pacientes diagnosticados de DM antes de los 30 años (pacientes similares a los incluidos en nuestro estudio) frente a la encontrada en 987 pacientes diagnosticados a edades más tardías. La incidencia en el grupo de pacientes jóvenes fue de 20.1 %, y se asociaba muy directamente a niveles más altos de HbA1c. Sin embargo, cuando analizamos esta asociación en nuestra muestra, encontramos que la Hemoglobina glicosilada al final del estudio no era

significativamente distinta entre aquellos pacientes con un aumento de grosor macular de al menos 11 % y el resto de pacientes, y tampoco encontramos ninguna diferencia estadísticamente significativa incluso entre aquellos con aumento de al menos 5 % y el resto de pacientes de la muestra (Figura 18).

La prevalencia en la muestra de **uso de bomba de insulina** al final del estudio fue de 39.24 %. Analizamos la relación del uso de este tratamiento con el grado de control metabólico. La cifra media de HbA1c en el grupo de pacientes que usaban bomba de insulina fue de 7.11 al final del estudio, mientras que la de los que no la usaban fue de 7.96. La diferencia entre las medias de hemoglobina glicosilada al final del estudio entre los que sí usan bomba y los que no es estadísticamente significativa (p-valor= 0.0007294). La diferencia era de entre 0.37 y 1.32 uds de HbA1c más alta en los pacientes que no usan bomba (IC del 95% (0.37 - 1.32). Estos datos confirman los resultados de múltiples estudios que indican que en adultos y adolescentes con DM tipo 1, la inyección subcutánea continua de insulina mediante bombas de infusión reduce los niveles de HbA1c y la frecuencia de hipoglucemia severa, y limita la ganancia excesiva de peso sin incrementar el riesgo de cetoacidosis, en comparación al tratamiento convencional de múltiples inyecciones diarias (139, 140, 141).

Por otro lado, analizamos la **relación del uso de la bomba de insulina y el grado de RD**. En el pasado, estudios de referencia como el DCCT (27) establecieron la relación entre el control intensivo de la glucemia y la evolución de la RD, describiendo un empeoramiento temprano de esta tras el inicio del tratamiento (sobre todo en aquellos pacientes con un mal control metabólico duradero previo). Sin embargo, describían también como los efectos a largo plazo de este control superaban ampliamente este riesgo. Además, describían que este riesgo era más evidente en aquellos pacientes con RDNP moderada o estadios más avanzados. En 2016, Klefter et al (142) estudiaron la relación entre el uso de la bomba de insulina y los niveles

de RD, y describen una mejora del control metabólico sin empeoramiento de la RD, pero sí con un ligero engrosamiento macular central que no induce EMD ni cambios significativos en otros parámetros maculares. En nuestro estudio se confirman estos datos, ya que los pacientes en tratamiento con bomba de infusión presentaban en un mayor porcentaje grados más leves de RD (en los pacientes que sí usaban bomba de insulina, el porcentaje de pacientes sin RD, con RD leve, o con RD moderada era de 53.7, 39.28 y 7.14 % respectivamente frente al 48.78, 29.26 y 21.95 % en los que no lo hacían en el grupo de controles, y del 66.66, 33.33 y 0 % frente al 14.27, 71.42 y 14.27 % respectivamente en el grupo de casos).

La **prevalencia de la RD** en nuestra muestra es de 35.44 %. La prevalencia de cualquier tipo de DR en población europea y americana varía enormemente dependiendo de la población de estudio y las características socioeconómicas de cada país, y oscilan entre 36.5 – 93.6% (143, 144). La **incidencia acumulada de RD** en nuestra muestra es de 25.49 %. En el estudio WESDR (Wisconsin Epidemiologic study of Diabetic Retinopathy), el mayor y más completo estudio epidemiológico de referencia, basado en pacientes DM tipo 1 diagnosticados antes de los 30 años, la incidencia acumulada a los 10 años se estimó en 89.3 % (145). Sin embargo, estudios más recientes rebajan esta cifra significativamente, como traducción de una actualización y mejora constante del control metabólico de estos pacientes. Martín Merino et al estiman una incidencia acumulada de 23.9 % a los 9 años en una muestra de pacientes DM tipo 1 recién diagnosticados en Reino Unido, cifra más parecida a la de nuestro estudio, a pesar de que en nuestra muestra los pacientes ya tenían un tiempo considerable de evolución de su DM (146).

El porcentaje de pacientes que desarrollaron **progresión de grado de RD** a lo largo del estudio fue de 22.78 %. De ellos, 15.18 % pasaron de no tener RD a RD leve, 1.26 % pasaron de no tener RD a RD moderada y 6.32 % pasaron de RD leve a RD moderada. El estudio WESDR

anteriormente citado estima la progresión de RD a lo largo de 10 años en un 76 – 69 % (en pacientes diagnosticados antes o después de los 30 años, respectivamente) (145) y no existen estudios más recientes que analicen la progresión de la RD a lo largo de 10 años, aunque estudios con diferentes periodos de seguimiento estiman cifras bastante inferiores a las del WESDR, aun así, siempre superiores a las encontradas en nuestro estudio (Tapp et al, 27.7 % acumulativa a los 6 años (147), Tam et al. 34.7 % acumulativa a los 4 años (148), ...)

El porcentaje de pacientes que presentaban **edema macular diabético** al final del estudio fue de 3.79 %., dato bastante inferior a las cifras publicadas en la mayoría de estudios internacionales al respecto, que estiman la prevalencia entre el 4.2 -7.9 % (143) La incidencia de EMD durante el periodo de estudio fue de 2.58 %. Esta incidencia acumulada contrasta con la publicada por Romero-Aroca y colaboradores (144) en 2011, basada en una muestra extraída de pacientes diabéticos tipo 1 sin RD de base al inicio del estudio, derivados de atención primaria en Tarragona, Hospital Universitari de Sant Joan de Reus, que fueron analizados igualmente durante diez años. En este estudio, de los escasos que hay publicados respecto a la epidemiología de la RD en España, la incidencia acumulada fue de 11.07.

Todos estos valores de nuestra muestra, salvando la dificultad que entraña la comparación directa o indirecta con valores de otras muestras de distintas poblaciones, distintos sistemas sociosanitarios, distintos periodos de análisis, etc, indican un control muy aceptable de la RD, con bajas prevalencias, incidencias y tasas de progresión de la enfermedad, posiblemente como traducción de un control metabólico más estricto gracias a nuestro sistema sanitario, con un mejor seguimiento o cumplimiento por parte de los pacientes y del equipo sanitario que les atiende, o un mejor estilo de vida en nuestra muestra de estudio. No podemos obviar la posibilidad de que un factor importante que influya en estas diferencias, además de los anteriormente mencionados, sea que la selección de los pacientes en nuestro estudio desde el

servicio de Endocrinología garantice un paciente motivado y con control adecuado de su enfermedad de base, además de ser pacientes con ausencia de RD o grados bajos de esta. De todas formas, la incidencia acumulada en nuestro estudio es de las más bajas que pueden encontrarse en estudios publicados hasta la fecha (3 – 25%) (143). Como hemos indicado anteriormente, la incidencia de RD y EMD es directamente proporcional al tiempo de evolución de la enfermedad, estimándose en estudios de referencia que a partir de los 15 años de evolución, el 15% de los DM tienen EMD, y que a partir de los 20 años, más del 90% presentará algún grado de RD. Estos valores de referencia, como hemos podido comprobar, distan mucho de ser aplicables a los pacientes de nuestra muestra, sugiriendo un buen abordaje de esta patología por parte de los profesionales sanitarios de nuestra área.

Tras el análisis demográfico y clínico de los pacientes de la muestra, realizamos un **análisis tomográfico del engrosamiento retiniano** experimentado por los pacientes a lo largo del estudio, centrándonos en el estudio de las variaciones en el grosor retiniano central de los pacientes de la muestra para poder compararlos con una base normativa de pacientes no diabéticos. Posteriormente, clasificamos aquellos pacientes de la muestra que habían experimentado mayores variaciones en el grosor retiniano a lo largo del estudio.

El tomógrafo de coherencia óptica Stratus de Zeiss (Carl Zeiss, Meditec, CA, USA) utilizado en este estudio es un modelo de tercera generación que proporciona imágenes en B-scan de la retina con una resolución de 8-10 micras. Es un instrumento muy preciso y fiable para monitorizar el grosor de la retina y compararlo en distintos momentos de la evolución de la patología. Diversos estudios han demostrado esta reproducibilidad, así como los protocolos de adquisición idóneos para optimizarla. (149, 150, 151). En otros estudios, como en la revisión bibliográfica de González L. et al (152), se resalta la importancia de realizar las sucesivas

mediciones con el mismo equipo de tomografía para evitar sesgos de medición. A pesar de que el modelo Stratus ha sido relevado por equipos mucho más potentes y con mayor precisión en la medición, las mediciones sucesivas de este análisis se realizaron siempre con el mismo equipo y el mismo software para mantener los mismos criterios de adquisición y procesamiento de imagen de acuerdo a los citados estudios. Se realizaron en cada paciente al inicio, durante y al final del estudio, scans a través de midriasis farmacológica utilizando el protocolo de adquisición *Fast Macular Thickness*, que utiliza en cada exploración 6 scans radiales de 6 mm de extensión centrados en la fovea para establecer el mapa de grosor retiniano macular. Este grosor se puede medir en cada uno de los 5 sectores maculares en los que se divide el mapa macular (centro, superior, inferior, nasal y temporal) como la distancia entre la interfase vitreoretiniana y la superficie anterior del epitelio pigmentario de la retina (153). (En este estudio se excluyeron las mediciones entre 3 y 6 mm de cada sector de cada ojo de cada paciente para simplificar el análisis de datos). Para la comparación de los pacientes de la muestra con pacientes no diabéticos utilizamos una base de datos normativa de pacientes obtenida por Carl Zeiss Meditec presentada en The StratusOCT™ Software Version 4.0 Brochure y que corresponde con la misma base de datos presentada en el 2005 *Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology*. (Fraser-Bell S, et al. IOVS 2005; ARVO E-Abstract 1542) (comunicación personal de J. Lipyanik, Carl Zeiss Meditec, May 31, 2007). En esta base de datos normativa se detectó una diferencia de grosor retiniano en función de la edad, el sexo y la etnia (valores más bajos de grosor retiniano en pacientes con mayor edad, sexo femenino y afroamericanos) (154) (sin embargo, no todos los estudios al respecto detectan estas diferencias en las variaciones en función de la edad, ni en función del sexo (155). En nuestra muestra, estos factores fueron controlados, ya que la distribución de pacientes por edad y por sexos era similar, como ya se ha resaltado previamente, y no existían distintas etnias.

Una vez validada la idoneidad de la muestra para el análisis de grosor retiniano, realizamos un análisis de conglomerados, o de clusters, que es una técnica estadística multivariante cuyo objetivo es agrupar elementos tratando de buscar la mayor homogeneidad en cada grupo y las mayores diferencias entre grupos. De esta manera, y aplicando secundariamente un análisis de número óptimo de clusters para definir el número de conglomerados que consigue explicar la mayor parte de la variabilidad de la muestra, definimos dos grupos distintos de pacientes dentro de la muestra. En el grupo de controles quedaron agrupados aquellos pacientes que, en global, habían experimentado un menor aumento del grosor macular durante el estudio, menor a 11% (de media 4.85 %). En el grupo de casos, quedaron agrupados aquellos pacientes con un aumento del grosor retiniano central superior a 11% (de media 19.73 %). Esta clasificación está respaldada por estudios previos de análisis de grosor macular medidos con OCT, en los cuales se sugiere el aumento porcentual de al menos 11 % como significativo a la hora de ser considerado como un aumento real de grosor y no un error de medición motivado por una falta de precisión en la prueba (motivada fundamentalmente por una deficiente alineación o una baja sensibilidad del sistema óptico del equipo de OCT utilizado en el estudio) (135).

Oshitari y colaboradores describieron en 2009 unos valores de grosor retiniano medios en los pacientes sin RD o con fases leves de la RD inferiores a los de pacientes sin DM (153). Sin embargo, creemos que esto no es aplicable a todas las poblaciones, y depende de muchos otros factores aún por determinar. La **media de grosor retiniano** en el sector central de todos los ojos incluidos en nuestra muestra al final del estudio fue de 219.24 micras, siendo la media en el grupo de controles de 213.94 micras, y en el grupo de casos de 255.8 micras. La media de grosor en el sector central en la base normativa de los pacientes no diabéticos del estudio de Chan y colaboradores fue de 212 +- 20 micras, y ningún paciente superó las 252 micras de

grosor central (155). Teniendo en cuenta estos resultados, la media de grosor retiniano global de todos los pacientes diabéticos de nuestra muestra, y del grupo de controles se encuentra dentro del intervalo de confianza de 212 ± 20 micras que indica la base normativa, y podemos concluir que en nuestra muestra, así como en otras muestras de estudios previos (153, 154, 155) los pacientes diabéticos sin RD o con RD leve o moderada no complicada tienen un grosor retiniano central similar al de pacientes sanos no diabéticos.

Sin embargo, la media de grosor en el sector central de los pacientes incluidos en el grupo de casos no está comprendida dentro del intervalo de confianza de la base normativa. Analizamos los **sectores** más afectados en este grupo, encontrando que el sector más afectado era el central. En ambos grupos de casos y controles, el sector que más engrosamiento experimentaba a lo largo del estudio con una diferencia estadísticamente significativa fue el central. Por lo tanto, consideramos que el área central es la primera en verse afectada en aquellos casos en que el paciente comienza a experimentar aumento del grosor retiniano sin llegar a poder detectarse un edema macular clínicamente significativo en la exploración de fondo de ojo. Por ello, deberíamos darle una importancia especial a valores centrales aumentados en pacientes diabéticos sin RD o con RD de bajo grado.

Realizamos un estudio de la posible **relación de los valores de HbA1c con el aumento de grosor retiniano** al final del estudio, no encontrando diferencias estadísticamente significativas entre aquellos pacientes con un aumento de grosor macular de al menos 5% y el resto de pacientes. Otros estudios han indicado esta falta de significación (156).

Una vez analizada demográfica, clínica y tomográficamente la muestra, nuestro objetivo se centró en evaluar si las **variaciones en los polimorfismos de diversos genes** que han sido

relacionados con la etiopatogenia de la retinopatía diabética pudieron suponer una especial predisposición en la instauración y el desarrollo del engrosamiento macular en los pacientes de nuestra muestra incluidos en el grupo de casos. Esta línea de investigación explora un campo de gran valor clínico, puesto que podríamos identificar pacientes con un riesgo aumentado de desarrollar RD o sus complicaciones asociadas, lo cual traería asociada una optimización de los recursos sanitarios, focalizando la actividad asistencial en aquellos pacientes con riesgo más elevado. La heredabilidad de la RD se ha llegado a establecer en torno al 27 %, incluso 52 % en el caso de la RD proliferativa (128). Hasta el momento, se han realizado múltiples estudios encaminados a entender la base genética de la RD mediante el estudio de genes aislados, estudios de asociación familiar, o, más recientemente, los GWAS (*genome wide association study*). Se ha publicado recientemente un gran número de estudios con genes y variantes genéticas potencialmente implicados. Algunos han demostrado asociaciones consistentes (como ALR, VEGF, RAGE genes,...) pero, sin embargo, los resultados no han podido ser reproducidos en otras poblaciones de estudio, por lo que aún no existe ninguna asociación genética globalmente reconocida que implique un riesgo elevado de RD o de cualquiera de sus complicaciones. Las diferencias en la selección de la población de base y en los objetivos clínicos, los sesgos de selección, y otros factores pueden ser responsables de una asociación genotipo-fenotipo que sea altamente significativa estadísticamente en una población pero no así en otra. Esta falta de consistencia puede reflejar la ausencia de consenso en la definición de la RD, el bajo número de las muestras de estudio, las diferencias genéticas entre las diferentes poblaciones de estudio, y en el diseño de los estudios (128). Por otro lado, la mayoría de los estudios publicados al respecto analizan la asociación de las distintas variantes genéticas con la RD, pero no directamente con el engrosamiento retiniano. Aparte de los relacionados con el VEGF, existen muy pocos estudios que analicen directamente esta relación, y aún están en fase

de desarrollo (*Evaluation of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in Patients With and Without Diabetic Macular Edema, National Eye Institute*).

Muchos SNPs del **VEGF** han sido asociados con la RD, la mayoría de ellos estando localizados en la región promotora del gen (79). El más importante de ellos es el localizado en +405, genotipo que ha sido implicado en un gran número de enfermedades, particularmente en las de base angiogénica, entre ellas la RD. Varios estudios llevados a cabo en Japón han detectado asociación entre el genotipo +405 o el alelo C y la presencia de RD (80-84). Sin embargo, estos hallazgos no han sido comprobados en la población caucásica (83). El genotipo GG de este polimorfismo se asoció a la RD proliferativa (85, 86). El genotipo CA del polimorfismo -2578 localizado en la región promotora del gen VEGF se asoció con la susceptibilidad de desarrollar RD en un estudio llevado a cabo por Carter et al (89) aunque estos resultados no han podido ser confirmados con otros estudios (88, 89). En el *Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC)*, el desarrollo de formas severas de la RD en pacientes con DM tipo 1 caucásicos se asoció con múltiples variantes del VEGFA estudiados mediante test multiSNPs (90). La relación de VEGF con el EMD ya instaurado ha sido ampliamente descrita en la literatura (88, 89, 90) y en este estudio, y constituye la principal vía de abordaje terapéutica actual de esta complicación. Sin embargo, no se ha descrito aún la relación de los distintos SNPs de VEGF y el grado de engrosamiento retiniano precoz en pacientes con grados leves de RD o en ausencia de ella. A pesar de la gran implicación de VEGF con la RD en general como se ha descrito, en nuestro estudio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el estudio del SNP rs699947 del gen VEGF entre los pacientes del grupo de casos y de controles.

En lo referente a **NOS3**, sus polimorfismos han sido relacionados con un aumento del riesgo de desarrollar RD (74). Varios estudios han encontrado asociaciones de polimorfismos

con RD y sus complicaciones vasculares, aunque estos resultados no han sido reproducibles en otros estudios similares (polimorfismo a/b del intrón 4 eNOS y desarrollo de RD en cohorte de población africana (94); C alelo del polimorfismo T-786C (74, 94, 96); Metanálisis de Zhao et al y la asociación del intrón 4a alelo del polimorfismo 4b/a con un riesgo reducido de desarrollar RD, y la asociación del C alelo del polimorfismo T-786C con factor de protección frente a la RD proliferativa (97). Sin embargo, en nuestro estudio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el estudio del SNP rs1799983 del gen NOS3 entre los grupos de casos y de controles.

En cuanto a **ET1**, muchos son los estudios que avalan el papel de la ET1 en la patogénesis de la RD. Apoyando la implicación de la ET1 en la RD, Shaw et al (103) detectaron que el antagonista de la ET1 puede prevenir el desarrollo de RD en un modelo genético de ratones no obesos con DM. Masuzawa et al (104) han demostrado la activación del sistema de endotelina en RD. Por otra parte, Li H et al (7) concluyen en sus publicaciones que el genotipo Asn/Asn del ET1 ha sido asociado con un riesgo reducido de RD y un retraso en la aparición o establecimiento de DM 2. Sin embargo, no hay estudios sobre la relación de ET1 y sus SNPs con el engrosamiento retiniano preclínico. De nuevo, en nuestro estudio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el estudio del SNP rs5370 del gen de ET1 entre los grupos de casos y de controles.

En cuanto a la familia de las interleucinas proinflamatorias, tampoco el análisis de los SNP de los genes de **IL1B**, **IL4** o **IL6** (rs16944, rs2070874 y rs1800795 respectivamente) y el engrosamiento retiniano determinó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de casos y controles en nuestro estudio, a pesar de la abundante literatura que relaciona a estas moléculas con la RD. Hay múltiples estudios que sugieren el uso de estas moléculas como biomarcadores de la DM, la HTA y la obesidad, ya que los SNP presentes en las regiones

reguladoras de los genes de las citoquinas son responsables de modular el nivel de expresión de estas y pueden ser modificadores del curso de la enfermedad. Asimismo, también se han descrito diferencias interindividuales en su producción, dando lugar a importantes variaciones en la respuesta inmunológica (105-127). Sin embargo, la mayoría de los estudios publicados se centran en estudiar estas relaciones en pacientes con DM 2, o se basan en el estudio directo de los niveles de interleucinas existentes en los tejidos oculares de pacientes diabéticos (humor acuoso o vítreo, fundamentalmente) y su relación con diversas fases o complicaciones de la patología (115, 119, 157), o con la respuesta de los pacientes al tratamiento (158). Pero no existen estudios directos que analicen la relación de los SNP con el engrosamiento retiniano precoz asociado a la evolución de la RD en pacientes DM 1 como en el nuestro.

En lo referente a **CD40**, su relación con la DM y la RD ha sido descrita en distintos trabajos. Portillo et al (159, 160) sugieren que puede promover la neurodegeneración y la apoptosis neuronal en pacientes con retinopatía diabética, y se encuentra expresada en la microglía y las células de Müller de retinas diabéticas, y podría producir un aumento de la síntesis de óxido nítrico por parte de estas células (126). En un ensayo con ratones CD40 deficitarios, estos resultaron estar protegidos frente al desarrollo de la RD, mostrando respuestas inflamatorias disminuidas asociadas a la RD, que sin embargo fueron desencadenadas mediante la estimulación de células retinianas con CD40 (160). Sin embargo, no existen estudios que correlacionen las variaciones en los genes que codifican para CD40 y la RD, y mucho menos, el EMD o el engrosamiento macular. En nuestro estudio, el análisis de esta relación para el SNP rs1883832 de CD40 no fue estadísticamente significativo.

En cuanto al análisis de **IL8**, con un enfoque más próximo a nuestras hipótesis, en un estudio llevado a cabo por Dong et al (14) en 2017, se publicó la correlación del genotipo AA de IL8 con una mayor susceptibilidad y progresión de la RD y un mayor riesgo de RDP de alto

riesgo, mientras que el T alelo de IP-10 C/T se asociaba a un menor riesgo de DR. Pero sin embargo, no encontraban asociación entre estos SNPs y el EMD. Por el contrario, en nuestro estudio, el análisis llevado a cabo para determinar la relación entre las diferencias de grosor retiniano de los pacientes de los grupos de casos y de controles y el SNP rs4073 del gen de la **IL8** sí encontramos valores estadísticamente significativos. En el análisis de la distribución de frecuencias de alelos y genotipos para este polimorfismo entre ambos grupos, el genotipo AT se encontraba con mayor frecuencia en el grupo de controles en comparación con los genotipos AA y T/T (Tabla 15), siendo estos resultados independientes de las diferencias de grosor retiniano existentes entre los varones y mujeres de la muestra (Tabla 17). Sin embargo, en el estudio de las distribuciones alélicas y de asociación de genotipos, no se encontraron valores significativos. Por tanto, la presencia del genotipo AT de este SNP en los pacientes de nuestra muestra se asoció con una menor susceptibilidad de desarrollar engrosamiento retiniano macular precoz al final del estudio. Es posible que la producción de las dos variantes de IL8 interfieran entre sí y modifique su actividad.

Este resultado sugiere la posible utilización de esta IL y del análisis de sus SNP como línea de investigación para su aplicación como posible marcador del desarrollo de engrosamiento retiniano macular precoz, pero las limitaciones de nuestro estudio aconsejan valorar estos resultados con precaución. El tamaño de la muestra final tras la exclusión de pacientes, sobre todo tras la pérdida de seguimiento de los mismos asociada a la larga duración de diez años del estudio, y la alta exigencia de los criterios de inclusión para seleccionar una muestra de pacientes controlados y sin patología sistémica significativa concomitante, no permite establecer relaciones de asociación genética lo suficientemente potentes como para extrapolarlas a otras poblaciones (161). La selección de pacientes en una fase más avanzada de la RD, o la ampliación de la muestra o del seguimiento en un estudio de cohortes podrían aportar un mayor

número de casos de engrosamiento retiniano precoz que refuerce nuestra hipótesis y potencie esta línea de investigación en el futuro.

Sin embargo, a pesar de estas y otras limitaciones reseñadas anteriormente, sí podemos señalar polimorfismos génicos que pueden determinar una mayor o menor susceptibilidad al desarrollo de engrosamiento retiniano macular en pacientes diabéticos tipo 1 en ausencia de RD o con RD de bajo grado, lo que supone un interesante marcador del desarrollo de la enfermedad y del inicio en la aparición de complicaciones asociadas, así como una novedosa línea de investigación que no había sido estudiada anteriormente.

CONCLUSIONES

1. La incidencia y la progresión de la RD durante diez años en la muestra de pacientes diabéticos tipo 1 de nuestro estudio es menor a la esperada en base a estudios previos de referencia y pone de manifiesto el buen control endocrinológico y oftalmológico de esta población.
2. El uso de la bomba de insulina conlleva un mejor control de la DM en los pacientes diabéticos tipo 1 de nuestra muestra.
3. Los cambios de grosor macular precoces en pacientes diabéticos tipo 1 de nuestra muestra son más evidentes y más precoces en el sector central retiniano del análisis macular mediante OCT.
4. No existe una relación estadísticamente significativa entre los cambios de grosor retiniano y los SNP rs5370 de ET1, rs699947 de VEGF, rs1799983 de NOS3, rs16944 de IL1B, rs2070874 de IL4, rs1800795 de IL6 y rs1883832 de CD40 en los pacientes diabéticos tipo 1 de nuestra muestra.
5. La expresión del genotipo AT del SNP rs4073 del gen de la IL8 en pacientes diabéticos tipo 1 de nuestra muestra se asocia a una menor susceptibilidad a desarrollar engrosamiento retiniano macular, siendo necesarios estudios de cohortes más amplios para confirmarlo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Williams R, Colaghuri S, Almutairi R, Aschner Montoya P, Basit P et al. International diabetes federation. International Diabetes Federation Atlas. Ninth edition. Inis Communication. 2019. 6-10. <https://www.diabetesatlas.org/upload/resources/2019>.
2. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas E et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the di@bet.es study. *Diabetologia*. 2012. 55:88-93.
3. Fong DS, Aiello L, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD et al. American Diabetes Association. Retinopathy in Diabetes. *Diabetes care*. 2004. 27 (suppl 1). 84-87.
4. Polito A, Del Borrello M, Isola M, Zemella N, Bandello F et al. Repeatability and reproducibility of fast macular thickness mapping with stratus optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol*. 2005.123(10):1330-1337.
5. Massin P, Vicaud E, Haouchine B, Erginay A, Paques M, Gaudric A. Reproducibility of retinal mapping using optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol*. 2001. 119(8):1135-42.
6. Suganthalakshmi B, Anand R, Kim R, Mahalakshmi R, Karthikprakash S, Namperumalsamy P et al. Association of VEGF and eNOS gene polymorphisms in type 2 diabetic retinopathy. *Mol. Vis*. 2006. 11(12): 336-341.
7. Li H, Louey JWC, Choy KW, T L Liu D, Man Chan W et al. EDN1 Lys198Asn is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Molecular Vision*. 2008.14:1698-1704.
8. Penn JS, Madan A, Caldwell RB, Bartoli M, Caldwell RW, Hartnett ME et al. Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Prog. Retin. Eye Res*. 2008. 27: 331-371.
9. Navarro-González FJ, Mora-Fernández C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2008. 19(3): 433-442.
10. Cardoso JF, Gomes KB, Fernandes AP, Domingueti CP. 2017. Evaluation of cytokines in type 1 diabetes patients with and without retinopathy. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 53(1): 31-37.
11. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005. 23:479-490.
12. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signaling. *Nature*. 1998. 394:200–203.
13. Sandra Torrades Oliva. Diversidad del genoma humano: los polimorfismos. *Offarm: farmacia y sociedad*. ISSN 0212-047X. Vol. 21. N°. 5. 2002. 122-126.

14. Dong L, Bai J, Jiang X, Yang MM, Zheng Y, Zhang H et al. The gene polymorphisms of IL-8(-251T/A) and IP-10(-1596C/T) are associated with susceptibility and progression of type 2 diabetic retinopathy in northern Chinese population. *Eye*. 2017. 31(4): 601-607.
15. Belloso J, Figuerola, D. La diabetes a lo largo de la historia. Figuerola D. *Diabetes*. 4ª Ed. Masson. 2003. 301p. p 2-10.
16. Bliss M. *The Discovery of insulin*. Chicago: The University of Chicago Press. 1982.
17. Kalantzis G, Angelou M, Poulakou-Rebelakou E. Diabetic retinopathy: an historical assessment. *Hormones*. 2006. 5(1): 72-75.
18. Ruta LM, Magliano DJ, Lemesurier R, Taylor HR, Zimmet PZ, Shaw JE. Prevalence of diabetic retinopathy in type 2 diabetes in developing and developed countries. *Diabet Med* 2013. 30 (4): 387-398.
19. Kohner E, Aldington S, Stratton I et al. United Kingdom Prospective Study. 30. *Archives of Ophthalmology*.1998. 116: 297-303.
20. Goldaracena MB, Escudero JM, Arrondo A et al. Prevalencia de Retinopatía diabética en una población diabética registrada en atención primaria. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*. 1998. Vol 73. Nº 5: 263-268.
21. Klein R, Klein BE, Moss SE et al. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy XV. The long term incidence of macular edema. *Ophthalmology*. 1995. 102: 7-16.
22. Crespo C, Borsa M, Soria-Juan A, Lopez Alba A, Lopez-Martinez N, Soria B. Costes directos de la diabetes mellitus y de sus complicaciones en España (Estudio SSCCAID: Spain Estimates Cost Ciberdem-cabimer in Diabetes) *Avances en diabetología*. 2013. 29: 182-9.
23. Mata-Cases M, Casajuana M, Mauricio D, Morros R, Hermosilla E, Fina F. 2013. El coste de la diabetes tipo 2: resultados de un estudio poblacional en Catalunya. XXIV Congreso de la Sociedad Española de Diabetes.
24. Informe sobre la ceguera en España. Ernst & Young para la Fundación RetinaPlus. 2012. p 89. https://www.seeof.es/archivos/articulos/adjunto_20_1.pdf.
25. Tufail A, Rudisil C, Egan C, Kapetanakis VV, et al. Automated Diabetic Retinopathy Image Assessment Software: Diagnostic Accuracy and Cost-Effectiveness Compared with Human Graders. *Ophthalmology*. 2017.124(3): 343-351.
26. Goldstein DE, Blinder KJ, Ide RJ et al. Glycemic control and development of retinopathy in youth onset insulin dependent diabetes mellitus. Results of 12 year longitudinal study. *Ophthalmology*. 1993. 100(8): 1133-1139.
27. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes in the development and progression of long term complications in insulindependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993. 329: 977-986.

28. Klein R, Klein BE, Moss SE. Epidemiology of Proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 1992. 15 (12):1875-1891.
29. Axel-Siegel R, Hod M, Fink-Cohen S et al. Diabetic retinopathy during pregnancy. *Ophthalmology*. 1996. 103: 1815-1819.
30. Moss SE, Klein R, Klein BE. Ocular factors in the incidence and progression of diabetic retinopathy. *Ophthalmology*. 1994. 101: 77-83.
31. Ryan S. *Retina*. Second edition. Vol 2. Retinal vascular disease. Mosby-Year Book Inc. 1994.
32. Diago JI, Elizalde J. Bases fisiopatogénicas de la retinopatía diabética. Elizalde J, López MI. *Retinopatía Diabética y otras complicaciones oculares de la diabetes Mellitus*. Editorial Trespuntzero. 2007. p 31-39.
33. Gabbay KH, Merola LO, Field RA. Sorbitol pathway: presence in nerve and chord with substrate accumulation in diabetes. *Science*. 1966. 151: 209-210.
34. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005. 54(6): 1615-1625.
35. Riva CE, Grunwald JE, Petrig BL. Autoregulation of human retinal blood flow. An investigation with laser Doppler velocimetry. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1986. 27: 1706-1712.
36. Fallon TJ, Maxwell D, Kohner EM. Retinal vascular autoregulation in conditions of hyperoxia and hypoxia using the blue field entopic phenomenon. *Ophthalmology*. 1985. 92: 701-705.
37. Koerner F, Imobersteg A, Nager G. Measurement of vascular diameters in diabetic retinopathy before and after photocoagulation. *Klin Monatsbl Augenheilkd*. 1990. 196: 354-356.
38. Bonafonte S, Frank RN, Gardner TW. Patogenesis de la retinopatía diabética. En: Bonafonte S, Garcia CA (eds). *Retinopatía diabética*. Madrid. Elsevier. 2006.
39. Aiello LP. *Invest Ophthalmol*. Vascular endothelial growth factor. 20th-century mechanisms, 21st-century therapies. *Vis Sci*. 1997. 38(9): 1647-1652.
40. Sivalingam A, Kenney J, Brown GC, Benson WE, Donoso L. Basic fibroblast growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*. 1990. 108(6): 869-872.
41. Klein BEK, Moss SE, Klein R et al. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy XIII. Relationship of serum cholesterol to retinopathy and hard exudates. *Ophthalmology*. 1991. 98: 1261-1265.
42. Fundus photographic risk factors for progression of diabetic retinopathy. ETDRS report number 12. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Group. *Ophthalmology* 1991. 98:807-22.

43. Muraoka K, Shimizu K. Intraretinal neovascularization in diabetic retinopathy. *Ophthalmology*. 1984. 91(12): 1440-1446.
44. Taylor E, Dobree JH. Proliferative diabetic retinopathy. Site and size of initial lesions. *Br J Ophthalmol*. 1980. 54(1): 11-18.
45. Guías de la American Diabetes Association (ADA): diagnóstico y tratamiento. 2014. <https://www.diabetes.org>.
46. Wilkinson CP, Ferris F, Klein et al. Proposed International Clinical Diabetic Retinopathy and diabetic macular edema Disease Severity Scales. *Ophthalmology*. 2003. 110: 1677-1682.
47. Early Treatment Diabetic retinopathy Study Research Group. Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs: an extension of the modified Arlie House classification. ETDRS Report number 10. *Ophthalmology*. 1991. 98: 786-806.
48. Panozzo G, Parolini B, Gusson, Mercanti A, Pinackatt S, Bertoldo G et al. Diabetic macular edema: an OCT based classification. *Seminars in Ophthalmology*. 2004. 19: 13-20.
49. Verdaguer J. Fluoroangiografía de retina. Alfaro V, Gomez-Ulla F, Quiroz-Mercado H, et al. Retinopatía diabética. Tratado médico quirúrgico. Madrid. MAC LINE. 2006. 53-60.
50. Diabetic Retinopathy. Preferred practice pattern. San Francisco: American Academy of Ophthalmology. 2003.
51. Coleman DJ, Silverman RH, Lizzi FL et al. Ultrasonography of the eye and orbit. Philadelphia. Lippincott Williams&Wilkins. 2006. 71-84.
52. Baumann M, Gentile RC, Liebman JM et al. Reproducibility of retinal thickness measurements in normal eyes using optical coherence tomography. *Ophthalmic Surg Lasers*. 1998. 29: 280-285.
53. Massin P, Vicaud E, Haouchine B et al. Reproducibility of retinal mapping using optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol* 2001. 119(8): 1135-1142.
54. Gomez Ulla F, Fernández MI, Rodriguez MJ et al. Tomografía de coherencia óptica en la retinopatía diabética. Alfaro V, Gómez Ulla F, Quiroz Mercado H et al. Retinopatía diabética. Tratado médico quirúrgico. Madrid: MAC LINE. 2006: 61-73.
55. Gomez Ulla F, Fernández MI, Rodriguez MJ et al. Tomografía de coherencia óptica en la retinopatía diabética. Alfaro V, Gómez Ulla F, Quiroz Mercado H et al. Retinopatía diabética. Tratado médico quirúrgico. Madrid: MAC LINE. 2006: 61-73.
56. Kashani AH, Chen CL, Gahm JK, Zheng F, Richter GM, Rosenfeld PJ et al. Optical coherence tomography angiography: A comprehensive review of current methods and clinical applications. *Prog Retin Eye Res*. 2017. 60: 66-100.

57. Standards of Medical Care in Diabetes –2018. American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2018. 41. Supl 1: 38-50.
58. Photocoagulation for diabetic macular edema. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study research group. *Arch Ophthalmol*. 1985. 103 (12): 1796-1806.
59. Gibran SK, Cullinane A, Jungkim S, Cleary PE. Intravitreal triamcinolone for diffuse diabetic macular oedema. *Eye (Lond)*. 2006. 20(6): 720-724.
60. Beck RW, Edwards AR, Aiello LP et al. Three year follow up of a randomized trial comparing focal/grid photocoagulation and intravitreal triamcinolone for diabetic macular edema. Diabetic Retinopathy clinical research network (DRCR.net). *Arch Ophthalmol*. 2009. 127: 245-251.
61. Funatsu H, Yamashita H, Ikeda T, Mimura T, Eguchi S, Hori S. Vitreous levels of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2003.110(9): 1690-1696.
62. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: Clustering of long-term complications in families with diabetes in the diabetes control and complications trial. *Diabetes*. 1997. 46: 1829-1839.
63. Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Woodward M, Billot L et al. Effects of a fixed combination of perindopril and indapamide on macrovascular and microvascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus (the ADVANCE trial): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2007. 370(9590): 829-840.
64. Emanuele N, Sacks J, Klein R, Reda D, Anderson R, Duckworth W et al. Veterans Affairs Diabetes Trial Group. Ethnicity, race, and baseline retinopathy correlates in the veterans affairs diabetes trial. *Diabetes Care*. 2005. 28(8): 1954-1958.
65. Sivaprasad S, Gupta B, Crosby-Nwaobi R, Evans J. Prevalence of diabetichic retinopathy in various ethnic groups: a worldwide perspective. *Surv Ophthalmol*. 2012. 57(4): 347-370.
66. Rema M, Saravanan G, Deepa R, Mohan V. Familial clustering of diabetic retinopathy in South Indian type 2 diabetic patients. *Diabet. Med*. 2002. 19: 910-916.
67. Hallman D.M, Huber J.C Jr, Gonzalez VH, Klein B.E, Klein R et al. Familial aggregation of severity of diabetic retinopathy in Mexican Americans from Starr County, Texas. *Diabetes Care*. 2005. 28: 1163-1168.
68. Monti M.C, Lonsdale JT, Montomoli C, Montross R, Schlag E, Greenberg D.A. Familial risk factors for microvascular complications and differential male-female risk in a large cohort of American families with type 1 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2007. 92: 4650-4655.
69. Arar N.H, Freedman BI, Adler S.G, Iyengar S.K, Chew E.Y, Davis M.D.et al. Family Investigation of Nephropathy and Diabetes Research Group. Heritability of the severity of diabetic retinopathy: the FIND-Eye study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2008. 49: 3839–3845.

70. Hietala K, Forsblom C, Summanen P, Groop P.H. Heritability of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2008. 57: 2176–2180.
71. Leslie R.D, Pyke D.A. Diabetic retinopathy in identical twins. *Diabetes*. 1982. 31: 19-21.
72. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: Clustering of long-term complications in families with diabetes in the diabetes control and complications trial. *Diabetes*. 1997. 46: 1829-1839.
73. Cho H, Sobrin L. Genetics of diabetic retinopathy. *Cur Diab Rep*. 2014.14(8): 515.
74. Abhary S, Hewitt AW, Burdon KP, Craig J.E. A Systematic Meta-Analysis of Genetic Association Studies for Diabetic Retinopathy. *Diabetes*. 2009. 58: 2137-2147.
75. Musunuru K, Lettre G, Young T, Farlow D.N, Pirruccello J.P, Ejebe K.G.et al. NHLBI Candidate Gene Association Resource. Candidate gene association resource (CARE): design, methods, and proof of concept. *Circ. Cardiovasc. Genet*. 2010. 3: 267–275.
76. Wirostko B, Wong TY, Simo R. Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. *Prog. Retin. Eye Res*. 2008. 27: 608-21.
77. Ishida S, Shinoda K, Kawashima S, Oguchi Y, Okada Y, Ikeda E. Coexpression of VEGF receptors VEGF-R2 and neutropilin-1 in proliferative diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2000. 41: 1649-56.
78. Simo R, Carrasco E, García-Ramírez M, Hernández C. Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Curr. Diabetes Rev*. 2006. 2(1): 71-96.
79. Vicenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*. 1996. 93: 1493-1495.
80. Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K et al. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002. 51(5): 1635-1639.
81. Awata T, Kurihara S, Takata N, Neda T, Iizuka H, Ohkubo T et al. Functional VEGF C-634G polymorphism is associated with development of diabetic macular edema and correlated with macular retinal thickness in type 2 diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2005. 333(3): 679-85.
82. Yang Y, Andresen B.T, Yang K, Zhang Y, Li, X., Wang H. Association of vascular endothelial growth factor -634C/G polymorphism and diabetic retinopathy in type 2 diabetic Han Chinese. *Exp. Biol. Med*. 2010. 235(10): 1204-1211.
83. Buraczynska M, Ksiazek P, Baranowicz-Gaszczyk I, Jozwiak L. Association of the VEGF gene polymorphism with diabetic retinopathy in type 2 diabetes patients. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2007. 22(3): 827-32.

84. Vailati F.B., Crispim D, Sortica D.A, Souza BM, Brondanim L.A, Canani LH. The C allele of -634G/C polymorphism in the VEGFA gene is associated with increased VEGFA gene expression in human retinal tissue. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2012. 53(10): 6411-6415.
85. Fegghi M, Nikzamir A, Esteghamati A, Mahmoudi T, Yekaninejad M.S. Relationship of vascular endothelial growth factor (VEGF) +405 G/C polymorphism and proliferative retinopathy in patients with type 2 diabetes. *Transl. Res.* 2011. 158(2): 85-91.
86. Bleda S, De Haro J, Varela C, Esparza L, Ferruelo A, Acin F. Vascular endothelial growth factor polymorphisms are involved in the late vascular complications in Type II diabetic patients. *Diab. Vasc. Dis. Res.* 2012, 9(1): 68-74.
87. Uthra S, Raman R, Mukesh B, Rajkumar SA, Padmaja K.R, Paul P.G.et al. Association of VEGF gene polymorphisms with diabetic retinopathy in a south Indian cohort. *Ophthalmic. Genet.* 2008. 29(1): 11-15.
88. Nakamura S, Iwasaki N, Funatsu H, Kinato S, Iwamoto Y. Impact of variants in the VEGF gene on progression of diabetic retinopathy. *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2009. 247: 2126.
89. Carter J.G, Cherry J, Williams K, Turner S, Bates D.O, Churchill A.J. Splicing factor polymorphisms. The control of VEGF isoforms and association with angiogenic eye disease. *Curr. Eye. Res.* 2011. 36(4): 328-35.
90. Al-Kateb H, Mirea L, Xie X, Sun L, Liu M, Chen H. et al. DCCT/EDIC Research Group. Multiple variants in vascular endothelial growth factor (VEGFA) are risk factors for time to severe retinopathy in type 1 diabetes: the DCCT/EDIC genetics study. *Diabetes.* 2007. 56(8): 2161-8.
91. Sheng H, Ignarro L.J. Biochemical and immunohistochemical characterisation of nitric-oxide synthase in the rat retina. *Pharm. Res.* 1996. 33: 29-34.
92. Li Q, Verna A, Han PY, Nakagawa T, Johnson RJ, Grant MB et al. Diabetic eNOS-knockout mice develop accelerated retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2012. 51(10): 5240-5246.
93. Chen Y, Huang H, Zhou Jm, Doumatey A, Lashley K, Chen G et al. Polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with diabetic retinopathy in a cohort of West Africans. *Mol. Vis.*, 2007. 26(13): 2142-2147.
94. Mamoulakis D, Bitsori M, Galanakis E, Vazgiourakis V, Panierakis C, Goulielmos GN. Intron 4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase eNOS gene and early microangiopathy in type 1 diabetes. *Int. J. Immunogenet.* 2009 36(3): 1537.
95. Santos KG, Crispim D, Canani L.H, Ferrugem PT, Gross JL, Roisenberg I. Relationship of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene polymorphisms with diabetic retinopathy in Caucasians with type 2 diabetes. *Ophthalmic. Genet.*, 2012. 33(1): 23-27.

96. Bazzaz JT, Amoli MM, Pravica V, Chanrasegaran R, Boulton AJ, Larijani B, Hutchinson IV. ENOS gene polymorphism association with retinopathy in type 1 diabetes. *Ophthalmic. Genet.* 2010 31(3): 103-107.
97. Zhao S, Li T, Zheng B, Zheng Z. Nitric oxide synthase 3 (NOS3) 4b/a, T-786C and G894T polymorphisms in association with diabetic retinopathy susceptibility: a meta-analysis. *Ophthalmic. Genet.*, 2012. 3(4): 200-207.
98. Manso Calderón, R. Análisis de polimorfismos de genes relacionados con la función endotelial y la muerte celular en demencia y enfermedad de alzheimer. p72. doi 10.14201/gredos.123009.
99. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1989. 86(8): 2863-2867.
100. Benatti L, Bonecchi L, Cozzi L, Sarmientos P. Two preproendothelin 1 mRNAs transcribed by alternative promoters. *Journal of Clinical Investigation.* 1993. 91(3):1149-1156.
101. Jenkins AJ, Joglekar MV, Hardikar AA, Keech AC, O'Neal DN, Januszewski AS. Biomarkers in Diabetic Retinopathy. *The Review of Diabetic Studies : RDS.* 2015.12(1-2):159-195.
102. Javadzadeh A, Ghorbanihaghjo A, Adl FH, Andalib D, Khojasteh-Jafari H, Ghabili K. Calcium dobesilate reduces endothelin-1 and high-sensitivity C-reactive protein serum levels in patients with diabetic retinopathy. *Molecular Vision.* 2013.19: 62-68.
103. Shaw SP, Boden J, Biecker E, Reichen J, Rothen B. Endothelin antagonism prevents diabetic retinopathy in NOD mice: A potential role of the angiogenic factor adrenomedullin. *Experimental biology and medicine.* 2006. 231: 1101-1105.
104. Masuzawa K, Jesmin S, Maeda S, Zaedi S, Shimojo N, Miyauchi T et al. 2006. Effect of endothelin dual receptor antagonist on VEGF levels in streptozotocin-induced diabetic rat retina. *Experimental biology and medicine.* 2006. 231. 1090-1094.
105. Luotola K, Pääkkönen R, Alanne M, et al. Association of variation in the interleukin-1 gene family with diabetes and glucose homeostasis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009. 94(11): 4575-4583.
106. Banerjee M, Saxena M. Genetic polymorphisms of cytokine genes in type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes.* 2014. 5(4): 493-504.
107. Hülsmeier M, Scheufler C, Dreyer MK. Structure of interleukin 4 mutant E9A suggests polar steering in receptor-complex formation. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2001. 57:1334-1336.
108. Genevay S, Di Giovine FS, Perneger TV, Silvestri T, Stingelin S, Duff G et al. Association of interleukin-4 and interleukin-1B gene variants with Larsen score progression in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism.* 2002. 47: 303-309.

109. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factoralpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1997. 82: 4196-4200.
110. Fried SK, Ricci MR, Russell CD, Laferrère B. Regulation of leptin production in humans. *J Nutri* 1998. 130: 3127-3131
111. Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? *Diabetes*. 2005. Suppl 2: 114-124.
112. Cardellini M, Perego L, D'Adamo M, Marini MA, Procopio C, Hribal ML et al. C-174G polymorphism in the promoter of the interleukin-6 gene is associated with insulin resistance. *Diabetes Care*. 2005. 28: 2007-2012.
113. Spranger J, Kroke A, Möhlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H et al. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 2003. 361: 226-228.
114. Qi L, van Dam RM, Meigs JB, Manson JE, Hunter D, Hu FB. Genetic variation in IL6 gene and type 2 diabetes: tagging-SNP haplotype analysis in large-scale case-control study and meta-analysis. *Hum Mol Genet* 2006. 15: 1914-1920.
115. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998. 102: 1369-1376.
116. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2000; 275: 18138-18144.
117. Kubaszek A, Pihlajamäki J, Komarovski V, Lindi V, Lindström J, Eriksson J, et al. Promoter polymorphisms of the TNF-alpha (G-308A) and IL-6 (C-174G) genes predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetes* 2003; 52: 1872-1876.
118. Vozarova B, Fernández-Real JM, Knowler WC, Gallart L, Hanson RL, Gruber JD et al. The interleukin-6 (-174) G/C promoter polymorphism is associated with type-2 diabetes mellitus in Native Americans and Caucasians. *Hum Genet* 2003; 112: 409-413.
119. Illig T, Bongardt F, Schöpfer A, Müller-Scholze S, Rathmann W, Koenig W, et al. Significant association of the interleukin-6 gene polymorphisms C-174G and A-598G with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004. 89: 5053-5058.
120. Hull J, Ackerman H, Isles K, Usen S, Pinder M, Thomson A et al. Unusual haplotypic structure of IL8, a susceptibility locus for a common respiratory virus. *Am J Hum Genet*. 2001. 69: 413-419.
121. Matsushima K, Oppenheim JJ. Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF. *Cytokine* 1989. 1: 2-13.

122. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 1989. 84: 1045–1049.
123. Elnor SG, Elnor VM, Jaffe GJ, Stuart A, Kunkel SL, Strieter RM. Cytokines in proliferative diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy. *Curr Eye Res* 1995. 14: 1045–1053.
124. Peters AL, Stunz LL, Bishop GA. CD40 and autoimmunity: the dark side of a great activator. *Semin Immunol*. 2009. 21: 293–300.
125. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signaling. *Nature*. 1998. 394:200–203.
126. Jana M, Liu X, Koka S, Ghosh S, Petro TM, Pahan K. Ligation of CD40 stimulates the induction of nitric-oxide synthase in microglial cells. *J Biol Chem*. 2001. 276: 44527–44533.
127. Jacobson E.M, Concepcion E, Oashi T, Tomer Y. A Graves' disease-associated Kozak sequence single-nucleotide polymorphism enhances the efficiency of CD40 gene translation: a case for translational pathophysiology. *Endocrinology*. 2005. 146: 2684–2691.
128. Simó-Servat O, Hernández C, Simó R. Genetics in Diabetic Retinopathy: Current Concepts and New Insights. *Current Genomics*. 2013. 14(5): 289–299.
129. Spisák S, et al. CAUSEL: an epigenome- and genome-editing pipeline for establishing function of noncoding GWAS variants. *Nat Med*. 2015. 23. doi: 10.1038/nm.3975
130. Zeggini E, Rayner W, Morris AP, Hattersley AT, Walker M, Hitman GA et al. An evaluation of HapMap sample size and tagging SNP performance in large-scale empirical and simulated data sets. *Nat. Genet*. 2005. 37: 1320–1322.
131. Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA. Genome-wide association studies theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet*. 2005. 6(2):109–118.
132. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991. 88(16):7276–7280.
133. Escudero Domínguez, FA. Estudio genético del síndrome pseudoexfoliativo. Universidad de Salamanca, España. 2017. 10.14201/gredos.135789. <http://hdl.handle.net/10366/135789>.
134. Salazar Montes, AM, Sandoval Rodriguez, AS, Armendariz Borunda JS. Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. Capítulo 13. Enzimas de restricción. Jaime González Cuevas; Miriam Ruth Bueno Topete. ISBN: 978-607-15-0912-3
135. Krzystolik MG, Strauber SF, Aiello LP, Beck RW, Berger BB, Bressler NM, et al. Reproducibility of macular thickness and volume using Zeiss optical coherence

- tomography in patients with diabetic macular edema. Diabetic Retinopathy Clinical Research Network. *Ophthalmology*. 2007. 114(8): 1520-5.
136. Johnson MW et al. Etiology and treatment of macular edema. *Am J Ophthalmol*. 2009 147(1):11-21.
 137. Bressler NM, Edwards AR, Antoszyk AN, Beck RW, Browning DJ, Ciardella AP, et al. Diabetic Retinopathy Clinical Research Network. Retinal thickness on Stratus optical coherence tomography in people with diabetes and minimal or no diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*. 2008. 145(5): 894-901.
 138. Wong AC, Chan CW, Hui SP. Relationship of gender, body mass index, and axial length with central retinal thickness using optical coherence tomography. *Eye (Lond)*. 2005. 19(3): 292-297.
 139. Bode BW, Tamborlane WV, Davidson PC. Insulin pump therapy in the 21st century: strategies for successful use in adults, adolescents, and children with diabetes. *Postgrad Med*. 2002. 111: 69-77.
 140. Bode BW, Sabbah HT, Gross TM, Fredrickson LP, Davidson PC. Diabetes management in the new millennium using insulin pump therapy. *Diabetes Metab Res Rev*. 2002. 18 (Suppl 1): 14-20.
 141. Plotnick LP, Clark LM, Brancati FL, Erlinger T. Safety and effectiveness of insulin pump therapy in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2003. 26: 1142-1146.
 142. Klefter ON, Hommel E, Munch IC, Nørgaard K, Madsbad S, Larsen M. Retinal characteristics during 1 year of insulin pump therapy in type 1 diabetes: a prospective, controlled, observational study. *Acta Ophthalmol*. 2016. 94(6): 540-547.
 143. Lee R, Wong TY, Sabanayagam C. Epidemiology of diabetic retinopathy, diabetic macular edema and related vision loss. *Eye Vis (Lond)*. 2015. 2:17.
 144. Romero-Aroca P, Baget-Bernaldiz M, Fernandez-Ballart J, Plana-Gil N, Soler-Lluis N, Mendez-Marin I, et al. Ten-year incidence of diabetic retinopathy and macular edema. Risk factors in a sample of people with type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011. 94(1): 126–32.
 145. Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin Epidemiologic Study of diabetic retinopathy. XIV. Ten-year incidence and progression of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*. 1994. 112(9):1217-1228.
 146. Martín-Merino E, Fortuny J, Rivero-Ferrer E, García-Rodríguez LA. Incidence of retinal complications in a cohort of newly diagnosed diabetic patients. *PLoS One*. 2014. 25. 9(6).
 147. Tapp RJ, Zimmet PZ, Harper CA, McCarty DJ, Chitson P, Tonkin AM, et al. Six year incidence and progression of diabetic retinopathy: results from the Mauritius diabetes complication study. *Diabetes Res Clin Pract*. 2006. 73(3): 298–303.

148. Tam VH, Lam EP, Chu BC, Tse KK, Fung LM. Incidence and progression of diabetic retinopathy in Hong Kong Chinese with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*. 2009. 23(3):185–93.
149. Paunescu LA, Schuman JS, Price LL, et al. Reproducibility of nerve fiber thickness, macular thickness, and optic nerve head measurements using StratusOCT. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004. 45(6):1716–1724.
150. Polito A, Del Borrello M, Isola M, Zemella N, Bandello F. Repeatability and reproducibility of fast macular thickness mapping with stratus optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol*. 2005. 123(10):1330-1337.
151. Massin P, Vicaud E, Haouchine B, Erginay A, Paques M, Gaudric A. Reproducibility of retinal mapping using optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol*. 2001 119(8):1135-1142.
152. Solé González L, Abreu González R, Alonso Plasencia M, Abreu Reyes P. Normal volume and thickness in spectral-domain OCT. Literature revision. *Soc. Canar. Oftal.*, 2012. 23: 19-25.
153. Oshitari T, Hanawa K, Adachi-Usami E. Changes of macular and RNFL thicknesses measured by Stratus OCT in patients with early stage diabetes. *Eye*. 2009. vol 23: 884–889.
154. Bressler NM, Edwards AR, Antoszyk AN, et al. Retinal thickness on Stratus optical coherence tomography in people with diabetes and minimal or no diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*. 2008. 145(5): 894–901.
155. Chan A, Duker JS, Ko TH, Fujimoto JG, Schuman JS. Normal macular thickness measurements in healthy eyes using Stratus optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol*. 2006.124(2):193–198.
156. Hannouche RZ, Avila MP. Retinal thickness measurement and evaluation of natural history of the diabetic macular edema through optical coherence tomography. *Arq Bras Oftalmol*. 2009. 72(4): 433-438.
157. Yao Y, Li R, Du J, Long L, Li X, Luo N. Interleukin-6 and Diabetic Retinopathy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Curr Eye Res*. 2019. 44(5): 564-574.
158. Hillier RJ, Ojaimi E, Wong DT, Mak MYK, Berger AR, Kohly RP, et al. Aqueous Humor Cytokine Levels and Anatomic Response to Intravitreal Ranibizumab in Diabetic Macular Edema. *JAMA Ophthalmol*. 2018.136(4): 382-388.
159. Portillo J-AC, Okenka G, Kern TS, Subauste CS. Identification of primary retinal cells and ex vivo identification of pro-inflammatory molecules in retinal cells using flow cytometry. *Mol Vis*. 2009. 15: 1383–1389.
160. Portillo JA, Greene JA, Okenka G, et al. CD40 promotes the development of early diabetic retinopathy in mice. *Diabetologia*. 2014. 57(10): 2222–2231.

161. Hampton BM, Schwartz SG, Brantley MA Jr, Flynn HW Jr. Update on genetics and diabetic retinopathy. *Clin Ophthalmol*. 2015. 9: 2175–2193.

ANEXOS

ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO

ESTUDIO SOBRE EL EDEMA MACULAR DIABÉTICO

Investigador principal: Dr Fernando Gómez Peralta¹. **Co-investigadores:** Dres. José Manuel Miralles García¹, José María Recio Córdova¹ Emiliano Hernández Galilea², Alvaro Casado², Rogelio González Sarmiento³.

¹S. de Endocrinología y Nutrición, ² S. de Oftalmología, ³Unidad de Medicina Molecular. Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca.

Fecha de aprobación por el Comité de Ética de la Universidad de Salamanca/Hospital Clínico Universitario de Salamanca:

A usted (o a su hijo/a menor de 18 años) le han ofrecido participar en un estudio de investigación. En un documento adjunto, le hemos proporcionado información sobre el estudio, los posibles problemas éticos derivados de su participación en el estudio, las medidas adoptadas para garantizar el respeto a los principios éticos de la investigación, los posibles beneficios derivados de su participación y su derecho a retirarse del estudio en cualquier momento. Si desea más información sobre el estudio o sobre los investigadores, puede contactar con ellos en el teléfono 923 291100. Si tiene preguntas o sugerencias sobre el proceso de obtención del consentimiento informado en este o en otros estudios, puede dirigirse a los investigadores o al Comité de Ética de la Universidad de Salamanca/Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

En este documento, solicitamos su firma de consentimiento a participar en el estudio.

Yo _____ (escriba su nombre y apellidos) he recibido del Dr. _____ información clara y a mi plena satisfacción sobre el "ESTUDIO SOBRE EL EDEMA MACULAR DIABÉTICO", en el que voluntariamente quiero participar, incluidos los riesgos potenciales. Sé que el estudio se realiza con fines de investigación.

	Firma	Fecha
Sujeto del estudio		
Investigador que recibe el consentimiento		

Autorizo a que las muestras de sangre se empleen en otros estudios de investigación aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Salamanca/Hospital Clínico Universitario de Salamanca:

- No Sí: deseo ser consultado en cada caso
- autorizo su uso en proyectos aprobados por el Comité, sin consultarme antes en cada caso

ANEXO 2: INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE

ESTUDIO SOBRE EL EDEMA MACULAR DIABÉTICO

Investigador principal: Dr Fernando Gómez Peralta¹. **Co-investigadores:** Dres. José Manuel Miralles García¹, José María Recio Córdova¹ Emiliano Hernández Galilea², Alvaro Casado², Rogelio González Sarmiento³.

¹S. de Endocrinología y Nutrición, ² S. de Oftalmología, ³Unidad de Medicina Molecular. Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca.

Fecha de aprobación por el Comité de Ética de la Universidad de Salamanca/Hospital Clínico Universitario de Salamanca:

A usted le han ofrecido participar en un estudio de investigación. En este documento, describiremos el estudio, los posibles problemas éticos derivados de su participación en el estudio, las medidas adoptadas para garantizar el respeto a los principios éticos de la investigación, los posibles beneficios derivados de su participación y su derecho a retirarse del estudio en cualquier momento.

Descripción del proyecto de investigación:

En este estudio de investigación, queremos saber si los pacientes con diabetes desarrollan edema macular diabético o, en cualquier caso, un aumento en el grosor de su retina y si aquellas personas en las que ocurre esto tienen con más frecuencia cierta característica genética (ciertos polimorfismos).

La exploración en Oftalmología será la habitual en todos los pacientes con diabetes. Además, para medir el grosor de su retina antes y después de iniciar este tratamiento se realiza una sofisticada prueba de imagen llamada tomografía de coherencia óptica (OCT), que permite evaluar de forma más precisa la presencia de edema macular al permitirnos medir de forma muy precisa el grosor de la retina.

La intervención específica de este estudio, que no sería precisa si el paciente no participara en esta investigación, consistirá en la obtención de 15 ml (aproximadamente, 15 mililitros, volumen equivalente a 3 cucharaditas de café) de sangre obtenida por venopunción (es decir, insertando una aguja en una vena, habitualmente en la flexura del codo). La sangre será procesada para medir los parámetros relacionados con la retinopatía diabética y analizar los genes mencionados. A continuación, compararemos los datos antes y 6 meses después de haber iniciado tratamiento y analizaremos los resultados.

Posibles problemas éticos relacionados con este estudio y medidas adoptadas para minimizar su aparición y su repercusión:

1. Potenciales problemas derivados de la venopunción: al puncionar una vena para obtener sangre se pueden producir hematomas, hemorragias o infección. Estas complicaciones son extremadamente infrecuentes y suelen ser fácilmente controlables mediante presión local o el uso de antibióticos locales. La infección rara vez requerirá el uso de antibióticos sistémicos (por boca o en vena).

Para tratar de minimizar este posible problema, la extracción de sangre será realizada por personal experto en este procedimiento, en el Laboratorio del Servicio de Endocrinología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

2. Potenciales problemas derivados del conocimiento de las variables del estudio por otras personas ajenas al paciente: Almacenaremos la información sobre los resultados en bases de datos. Sólo los investigadores tendrán acceso a la base de datos y evitaremos el acceso de personas ajenas al paciente o al equipo investigador a datos sobre el paciente. Los tubos que contengan sangre serán etiquetados con un número, no con el nombre del paciente.

Los resultados de las pruebas realizadas (valoración oftalmológica, niveles de parámetros bioquímicos relacionados con la retinopatía diabética y análisis de polimorfismos) serán comunicados al paciente o, si procede, a sus padres o tutores legales, por el médico solicitante. El investigador principal estará a disposición de los sujetos del estudio para contestar las preguntas que puedan tener sobre este estudio.

Medidas tomadas para garantizar el respeto a los principios de la ética en la investigación clínica

Este protocolo de investigación ha sido aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico Universitario de Salamanca. Los investigadores se comprometen a llevar a cabo su investigación de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki, que protege a los sujetos de estudios de investigación.

Posibles beneficios derivados de su participación en el estudio

La actualización de su estudio oftalmológico garantiza el correcto seguimiento médico de su enfermedad.

Derecho a retirarse del estudio

Usted tiene derecho a rechazar la participación en el estudio y a retirarse después de empezarlo, durante cualquier momento del estudio. La atención que usted recibe de sus médicos no cambiará en modo alguno si usted decide no participar o si se retira del estudio.

Autorización del paciente para emplear las muestras de sangre también en otros estudios de investigación

Si usted nos autoriza para ello, sería posible emplear la muestra de sangre que extraeremos para este estudio también en otros estudios de investigación. Por ejemplo, podríamos querer investigar la influencia de otros genes sobre la diabetes.

- Si no nos autoriza, destruiremos su muestra de sangre una vez finalizado este estudio.

- Si decide autorizarnos, existen dos modalidades:

- puede autorizarnos requiriendo consultar previamente con usted (antes de cada estudio en el que deseemos emplear la sangre)
- puede autorizarnos sin requerir consulta previa con usted, para su uso en los proyectos que hayan recibido aprobación del Comité de Ética del Hospital Clínico Universitario de Salamanca

Si desea más información sobre el estudio o sobre los investigadores, puede dirigirse al teléfono 923 291100.

- Si tiene preguntas o sugerencias sobre el proceso de obtención del consentimiento informado en este o en otros estudios, puede dirigirse a los investigadores o al Comité de Ética del Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

ANEXO 3: DATOS TOMOGRÁFICOS INICIO / FINAL DEL ESTUDIO

Tabla en la que se incluyen los datos tomográficos en micras de cada sector de cada ojo de cada paciente al inicio y al final del estudio.

En azul se recogen los datos de los pacientes incluidos en el grupo de casos.

En negro se recogen los datos de los pacientes incluidos en el grupo de controles.

Abreviaturas de la tabla:

- Código: número identificación de paciente
- OD: ojo derecho
- OI: ojo izquierdo
- CENT: región central (1 mm) (CSF *central subfield thickness*) al inicio del estudio
- CENT 2: región central (1 mm) (CSF *central subfield thickness*) al final del estudio
- SUP: sector superior interno (1-3 mm) al inicio del estudio
- SUP 2: sector superior interno (1-3 mm) al final del estudio
- NAS: sector nasal interno (1-3 mm) al inicio del estudio
- NAS 2: sector nasal interno (1-3 mm) al final del estudio
- INF: sector inferior interno (1-3 mm) al inicio del estudio
- INF 2: sector inferior interno (1-3 mm) al final del estudio
- TEMP: sector temporal interno (1-3 mm) al inicio del estudio
- TEMP 2: sector temporal interno (1-3 mm) al final del estudio

CÓDIGO	VALORES TOMOGRÁFICOS AL INICIO DEL ESTUDIO (micras)										VALORES TOMOGRÁFICOS AL FINAL DEL ESTUDIO (micras)									
	CENT_OD	CENT_OI	SUP_OD	NAS_OD	INF_OD	TEM_OD	SUP_OI	NAS_OI	INF_OI	TEM_OI	CENT_OD2	CENT_OI_2	SUP_OD_2	NAS_OD_2	INF_OD_2	TEM_OD_2	SUP_OI_2	NAS_OI_2	INF_OI_2	TEM_OI_2
18776	183	189	241	258	240	220	236	251	246	221	201	199	254	272	253	231	252	265	259	235
13635	251	257	251	283	248	226	258	296	261	241	262	267	258	295	252	235	255	292	258	242
19086	196	189	251	272	249	230	247	273	253	235	217	204	255	282	262	236	255	281	263	247
19137	211	202	239	246	232	229	218	239	231	219	271	200	235	275	239	202	239	233	215	159
19479	183	188	230	245	229	221	236	241	227	221	217	211	246	267	240	224	239	256	250	235
18964	194	212	214	237	210	199	224	249	223	207	216	225	226	253	224	208	225	247	232	215
19126	215	231	288	290	271	276	288	293	260	247	232	264	284	280	262	253	276	289	273	256
18814	182	182	237	260	233	225	237	250	238	234	199	186	248	263	231	244	247	259	246	254
18799	163	167	229	243	229	240	224	239	225	210	261	185	231	266	223	182	231	244	229	211
19165	183	201	237	251	230	215	235	264	245	222	200	215	258	273	243	234	251	287	263	247
19369	186	191	228	248	232	207	231	246	232	212	205	210	243	270	251	219	249	267	257	229
19164	212	201	236	260	255	235	242	261	251	235	198	203	244	271	257	242	248	272	255	239
19017	195	200	252	273	245	235	243	269	251	249	215	218	269	297	257	248	255	287	270	265
18909	186	177	249	274	237	226	250	266	234	231	250	248	298	314	279	281	306	319	282	282
19105	185	200	244	265	252	227	246	270	234	221	202	212	261	289	268	239	251	280	241	233
18963	178	186	241	265	237	218	251	264	249	231	208	211	251	272	257	232	271	292	273	251
18842	235	232	231	255	241	210	251	276	247	224	247	244	244	277	259	224	261	289	257	239
18787	172	172	260	266	243	228	253	267	240	218	183	181	265	282	247	225	259	272	252	232
18911	208	226	219	244	222	203	233	258	228	211	222	241	232	259	237	219	251	269	236	226
19203	204	212	235	265	230	221	241	261	231	221	218	224	242	280	238	228	243	268	243	229
18840	212	184	240	279	230	222	249	285	261	222	223	201	252	294	243	240	257	299	272	231
18786	185	179	221	231	216	213	229	243	221	210	199	235	271	284	248	240	278	285	255	248
18877	176	195	229	248	225	208	227	248	229	216	199	234	240	249	228	217	218	263	249	212
18826	172	177	254	263	255	227	262	264	250	224	195	188	261	272	263	241	268	269	265	237
19512	202	197	229	254	224	214	229	249	229	214	209	206	233	265	229	222	236	261	237	226
19255	218	221	247	280	241	224	267	272	241	237	232	239	256	297	253	227	276	293	260	249
19107	231	227	250	276	263	238	246	263	262	240	291	288	296	316	285	279	286	315	304	281
18891	195	201	230	246	220	223	247	253	230	234	207	217	232	249	225	218	245	251	241	233

	VALORES TOMOGRÁFICOS AL INICIO DEL ESTUDIO (micras)										VALORES TOMOGRÁFICOS AL FINAL DEL ESTUDIO (micras)									
19178	213	222	247	280	241	214	229	249	229	214	282	289	289	303	291	282	294	305	294	286
19389	215	218	251	273	250	247	253	282	256	244	249	234	247	279	257	233	251	285	261	252
18817	186	200	222	236	208	199	226	242	232	208	194	210	231	249	224	209	229	247	233	215
18771	205	205	251	273	250	247	253	282	256	244	261	254	286	312	286	268	281	309	291	268
18775	211	209	252	271	252	241	260	282	252	244	225	252	267	288	266	258	264	291	276	263
19154	183	173	255	287	234	223	238	272	239	228	260	202	251	308	264	216	244	273	258	236
18869	145	147	233	246	226	213	230	248	226	215	163	160	240	256	231	222	239	262	235	229
19150	230	223	249	279	216	212	239	261	242	215	223	238	241	258	217	200	241	262	242	204
19139	265	241	246	278	256	245	222	268	248	220	242	245	246	205	260	252	192	284	197	218
18781	195	205	222	236	208	199	226	242	232	208	203	205	235	254	228	220	234	245	224	225
19461	186	189	238	259	221	194	250	265	238	215	199	201	248	267	237	205	265	279	251	227
19211	194	195	241	253	224	220	241	246	218	222	202	208	249	265	244	242	261	269	231	233
18896	188	188	256	264	245	231	252	262	245	231	210	213	257	276	255	236	260	269	266	249
19225	252	169	298	259	224	256	223	235	216	218	180	179	234	246	214	220	229	242	229	234
18841	217	210	215	235	205	198	230	235	208	203	233	230	230	251	220	219	247	250	220	224
19511	222	234	259	280	256	239	262	296	257	235	250	251	270	299	271	251	277	310	274	244
18868	252	209	238	256	246	242	226	245	224	215	269	221	252	279	261	260	241	261	239	227
19085	194	193	234	252	226	218	240	249	229	217	208	204	237	266	263	229	241	261	247	223
19149	162	162	236	261	244	221	241	255	237	232	175	163	253	271	261	245	255	277	259	245
18784	161	166	217	244	232	219	225	242	227	210	183	190	222	259	238	217	242	259	239	231
19109	210	213	267	291	241	234	253	294	239	243	224	228	268	289	258	247	279	294	262	266
19136	190	202	234	267	237	217	241	266	236	234	200	199	250	281	242	224	246	281	250	237
18914	215	206	249	265	247	243	245	265	237	227	283	279	319	310	291	297	299	311	279	284
18871	163	165	240	250	234	224	241	245	238	226	197	191	248	269	253	229	244	272	217	236
19193	223	216	247	284	232	226	259	289	228	221	269	274	283	318	276	270	303	316	276	281
18816	240	209	272	285	254	256	297	269	244	239	230	268	289	311	289	306	291	309	296	312
18986	177	174	241	272	240	228	243	255	226	228	198	207	234	284	253	227	244	268	253	266
18979	168	172	242	257	230	220	237	248	232	223	201	217	249	271	250	232	250	266	255	249
18895	199	203	242	271	248	235	249	275	248	242	214	231	255	289	267	255	256	292	268	252
18866	214	217	223	240	221	209	233	241	232	223	230	226	237	248	219	213	239	247	231	223

	VALORES TOMOGRÁFICOS AL INICIO DEL ESTUDIO (micras)										VALORES TOMOGRÁFICOS AL FINAL DEL ESTUDIO (micras)									
18774	185	185	227	266	235	212	235	258	235	223	200	205	223	270	231	215	240	259	240	230
12375	183	195	251	288	255	230	248	275	255	241	241	249	315	339	298	290	313	338	312	295
18864	185	187	219	218	182	187	200	206	183	190	193	204	215	241	184	183	214	231	185	193
18838	184	180	240	259	220	227	236	253	224	231	186	183	246	259	212	217	233	249	223	229
19108	166	170	190	217	199	185	186	220	197	194	201	210	215	229	219	208	203	237	214	214
18810	180	193	227	252	228	210	239	256	238	221	199	211	235	267	233	229	251	270	248	232
18783	193	203	261	281	270	236	256	281	278	237	203	212	269	287	277	243	270	291	287	255
18815	172	178	227	245	237	215	231	254	241	216	188	190	242	265	250	222	240	257	244	231
19155	190	191	221	239	224	207	227	247	228	210	208	212	233	249	236	226	236	258	240	219
18932	205	208	245	251	218	220	240	249	229	223	254	284	275	283	244	253	276	288	261	264
19448	156	165	206	222	208	194	213	220	209	197	190	195	225	247	231	229	235	241	219	218
13156	199	204	245	271	244	225	253	277	248	231	226	217	255	275	254	238	250	283	247	228
18867	213	262	223	255	245	217	217	265	224	195	215	233	222	256	256	230	233	259	236	222
18865	211	210	253	269	238	234	247	264	239	226	220	222	260	277	243	237	254	276	247	235
19495	231	230	240	261	237	222	238	252	234	223	258	254	248	269	232	241	242	266	245	234
19345	173	184	230	250	234	216	231	254	225	214	202	195	233	256	238	220	228	255	236	225
18785	159	150	220	234	214	201	211	223	206	200	175	182	218	236	221	193	216	224	201	203
19221	192	190	237	259	230	217	238	252	235	226	209	211	255	285	249	232	253	267	254	248
19166	216	214	259	271	239	229	245	264	241	231	227	240	257	276	249	231	259	277	254	243
18777	192	218	276	290	271	260	273	284	271	261	195	232	267	280	268	266	264	290	282	296
18823	220	230	243	263	232	235	242	256	232	235	233	215	238	265	238	252	240	262	236	233



